



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

DÉBORA GRANEMANN E SILVA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL
DA *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (ERVA CIDREIRA)
E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

FLORIANÓPOLIS – SC

2008

DÉBORA GRANEMANN E SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL
DA *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (ERVA CIDREIRA)
E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
disciplina QMC 5231 – Estágio Supervisionado,
do Curso de Bacharel em Química, da
Universidade Federal de Santa Catarina,
desenvolvido no semestre 2008.1.
Orientadora: Prof^ª. Dra. Inês M^a Costa Brighente

FLORIANÓPOLIS, 04 JUNHO DE 2008

... "Sou um elétron", disse a forma. "Sou um elétron spin para cima. É fácil me distinguir da minha amiga ali, a elétron spin para baixo, que é obviamente muito diferente de mim." E disse para si mesmo num tom baixinho, algo que soou como "Vive la différence"...

ALICE NO PAÍS DO QUANTUM
ROBERT GILMORE (1995)

AGRADECIMENTOS

A orientadora prof^ª. Dr^ª. Inês M. Costa Brighente pela oportunidade, incentivo, dedicação e auxílio em todas as etapas deste trabalho. Pela confiança e liberdade concedida na escolha do tema deste trabalho;

Ao prof^º Dr. Moacir Geraldo Pizzolati pelas valiosas discussões, sugestões e participação nas determinações estruturais;

A prof^ª. Dr^ª. Maria da Graça Nascimento, coordenadora do Laboratório de Síntese e Biocatálise desta universidade, pelo auxílio na determinação da rotação óptica e do índice de refração;

Ao prof^º Dr^º Faruk J. N. Aguilera, coordenador do Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais, pela disponibilização do equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ao aluno de doutorado Jacques Priebe pela paciência e valioso auxílio na realização das análises e varreduras;

Ao prof^º Daniel de Barcellos Falkenberg, do Departamento de Botânica a UFSC, pela identificação da espécie vegetal que é tema deste trabalho;

A mãe da professora Inês, pela disponibilização da espécie estudada, a qual foi coletada da sua residência em Santo Amaro da Imperatriz (SC);

A todos os professores do Departamento de Química, que se dedicam ao ensino de graduação na Universidade Federal de Santa Catarina, que colaboraram na interdisciplinaridade possibilitando uma formação acadêmica harmoniosa e profícua na produção de informações que me foram essenciais na elaboração deste trabalho de conclusão de curso.

A todos os colegas de graduação e especialmente aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais com os quais compartilhei momentos de amizade e aprendizagem;

A todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2-1. Óleos Essenciais	3
2-1-1. Composição dos Óleos Essenciais	5
2-1-2. Biossíntese de Óleos Essenciais	8
2-1-3. Extração e Armazenamento de Óleos Essenciais.....	10
2-1-4. Caracterização de Óleos Essenciais	12
2-1-5. Métodos Cromatográficos de Análise	12
2-1-6. Controle da Identidade e da Pureza	13
2-2. Espécie Vegetal <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	14
3. OBJETIVOS	17
3-1. Objetivos Gerais	17
3-2. Objetivos Específicos	17
4. PARTE EXPERIMENTAL	18
4-1. Material Vegetal	18
4-2. Método de extração e armazenamento	18
4-3. Análise dos Óleos Essenciais	19
4-3-1. Propriedades Físico-Químicas	19
4-3-2. Análise Cromatográfica por CG	19
4-3-3. Análise Cromatográfica por CG-EM	19
4-3-4. Índice de Retenção de Kovats.....	20
4-3-5. Investigação da Toxicidade Usando Larvas de <i>A. salina</i> (TAS)	20
4-3-6. Investigação da Atividade Antimicrobiana	21
4-3-7. Investigação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical Livre DPPH (2,2-Difenil-picril-hidrazil)	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
5-1. Propriedades Físico-Químicas	23
5-2. Determinação da Composição do Óleo Essencial	23
5-3. Investigação da Toxicidade Usando Larvas de <i>A. salina</i> (TAS)	33
5-4. Investigação da Atividade Antimicrobiana	34
5-5. Investigação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical Livre DPPH (2,2-Difenil-picril-hidrazil)	35
6. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
APÊNDICE	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema simplificado da principal rota de biossíntese de metabólitos secundários e suas interações com o metabolismo primário	4
Figura 2.	Exemplos de monoterpenos	6
Figura 3.	Exemplos de sesquiterpenos.....	8
Figura 4.	Esboço da biossíntese de terpenos. A unidade básica C ₅ dos terpenos é sintetizada por duas rotas diferentes. Os intermediários fosforilados, IPP e DMAPP, se combinam para formar C ₁₀ , C ₁₅ e outros terpenos maiores.....	9
Figura 5.	Foto de uma glândula capilar de uma folha jovem de girassol (<i>Balsamorhiza sagittata</i>).....	10
Figura 6.	Aparelho de Clevenger: (A)manta aquecedora, (B)Balão de 1 L, (C)Vidraria de Clevenger, (D)Condensador, (E)Erlenmayer e (F)Suporte universal.....	12
Figura 7.	Espécie vegetal <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	15
Figura 8.	Folhas de <i>Lippia alba</i> recém colhidas.....	18
Figura 9.	Destilação por arraste a vapor com aparelho de Clevenger.....	18
Figura 10.	Óleo essencial em vidro âmbar.....	18
Figura 11.	Cromatograma do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brwon	24
Figura 12.	Espectros de massas do β-mirceno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	25
Figura 13.	Proposta para a fragmentação do β-mirceno quando analisado em CG-EM.....	25
Figura 14.	Espectros de massas do β-citral. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).....	26
Figura 15.	Proposta para a fragmentação do β-citral quando analisado em CG-EM.....	26
Figura 16.	Espectros de massas do α-citral. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)	27
Figura 17.	Espectros de massas do germacreno B. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	28
Figura 18.	Cromatograma do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brwon	29
Figura 19.	Cromatograma da série homóloga de alcanos alifáticos (C ₁₀ -C ₃₀).....	29
Figura 20.	Estruturas propostas para os componentes detectados no óleo essencial extraído da <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brwon	32
Figura 21.	Gráfico da LD ₅₀ do óleo essencial de <i>L. alba</i> na investigação de toxicidade usando larvas de <i>A. Salina</i>	33
Figura 22.	Gráfico da LD ₅₀ do controle positivo das larvas de <i>A. Salina</i>	33
Figura 23.	Cromóforo DPPH.....	35
Figura 24.	Gráfico para determinação de IC ₅₀ do óleo essencial da <i>L. alba</i> na investigação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH.....	35
Figura 25.	Espectros de massas do Sabineno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).....	40

Figura 26.	Espectros de massas do p-Cimeno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	40
Figura 27.	Espectros de massas do β -Ocimeno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	41
Figura 28.	Espectros de massas do γ -Terpineno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	41
Figura 29.	Espectros de massas do Linalol. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).....	42
Figura 30.	Espectros de massas do trans-Verbenol. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	42
Figura 31.	Espectro de massas do cis-Crisantenol obtido da amostra. Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica <u>indisponível</u> para consulta (NIST).....	43
Figura 32.	Espectros de massas do Geranil acetato. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	43
Figura 33.	Espectros de massas do β -Elemeno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	44
Figura 34.	Espectros de massas do β -Cariofileno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	44
Figura 35.	Espectro de massas do γ -Elemeno obtido da amostra. Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica <u>indisponível</u> para consulta (NIST).....	45
Figura 36.	Espectros de massas do α -Humuleno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	45
Figura 37.	Espectros de massas do Germacreno-D. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	46
Figura 38.	Espectros de massas do Germacreno-A. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST)..	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Componentes do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown, tempo de retenção, índice de retenção de Kovats e percentagem em área	31
Tabela 2.	Atividade antimicrobiana do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown, frente aos microrganismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMV	Ácido Mevalônico
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DL	Dose letal
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
FPP	Farnesil difosfato
GPP	Geranil difosfato
IC	Concentração Inibitória
IK	Índice de retenção de Kovats
IPP	Isopentenil difosfato
MeOH	Metanol
MEP	Metileritritol fosfato
UV-VIS	Ultra violeta – Visível

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico de diversas partes das plantas como folhas, flores e frutos. Ocorrem em diversos gêneros de plantas superiores e inferiores e constituem uma mistura complexa de substâncias, apresentando estruturas químicas heterogêneas. As técnicas mais usuais para sua obtenção são: prensagem ou expressão, extração com solventes orgânicos ou com gorduras, com fluido supercrítico, destilação por arraste de vapor ou, ainda, *headspace* (microdestilação em fase sólida).

Quimicamente, os óleos essenciais são compostos com baixo peso molecular, constituindo misturas bastantes variáveis de fenilpropanóides e terpenóides, especificamente monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), embora diterpenos (C_{20}) também possam estar presentes, além de uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados ou insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas.

Devido a sua freqüente presença nos vegetais e variedade de composição química, os óleos essenciais constituem objeto de extensivos estudos visando identificar atividades biológicas e os resultados apontam um potencial terapêutico importante. Porém, devido à complexidade química, torna-se difícil relacionar a atividade com as substâncias presentes (Tepe et al., 2005). Porém, em alguns casos, o óleo de uma planta pode apresentar um constituinte majoritário, como o de canela, que contém mais de 85% de cinamaldeído (Dominguez, 1973; Duke, 1985), tornando mais evidente a correlação entre a química e a atividade. Entretanto, substâncias presentes em menores quantidades podem contribuir pelo menos em parte para a ação possivelmente por sinergismo entre os componentes. Também a variação da constituição associada à existência de diferentes quimiotipos das espécies (ocasionados por fatores genéticos e influência do meio ambiente sobre o metabolismo dos terpenóides) entre outros, são fatores que dificultam a determinação inequívoca da atividade. Assim, inúmeras investigações são realizadas com componentes isolados.

Dentre as principais atividades farmacológicas dos óleos essenciais destacam-se: antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, antihelmíntica, antiparasitária, analgésica, sedativa, antitumoral, entre outras. Também é de importância atualmente, sua utilização na indústria farmacêutica como promotores de permeação de fármacos para administração pela via transdérmica.

Atualmente, os óleos essenciais são empregados na indústria alimentícia, farmacêutica, de

cosméticos e produtos de limpeza, além de utilizados na aromaterapia. É estimado que cerca de 3000 óleos essenciais sejam conhecidos, dos quais aproximadamente 300 são comercialmente importantes, destinados principalmente para o mercado de fragrâncias (Burt, 2004). Componentes individuais dos óleos são também usados, obtidos tanto por extração de matéria vegetal como produzidos por síntese. No Brasil, a regulamentação de uso destes produtos como aditivos ou adjuvantes é realizada pela ANVISA (Brasil, 1999).

A razão do estudo do tema proposto emerge no interesse da identificação de espécies produtoras de óleo essencial com vistas nas suas possíveis aplicações “in natura” ou como fonte de precursores de outras substâncias de maior valor agregado em indústrias cosméticas e farmacêuticas. O amplo emprego da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown nas práticas caseiras da medicina popular é motivo suficiente para sua escolha como tema de estudos químicos, seguido de estudos farmacológicos e clínicos visando sua validação como medicamento eficaz e seguro. Além disso, justifica-se a elucidação e fixação do seu quimiotipo, através de análises químicas do óleo essencial e ensaios farmacológicos direcionados para cada tipo de atividade.

Este trabalho visa a extração do óleo essencial da espécie vegetal *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, assim como análise deste óleo através de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas com posterior avaliação de toxicidade frente a larvas de *Artemia Salina*, atividade antimicrobiana e antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2-1. Óleos Essenciais

De forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como por exemplo a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí, a denominação de *óleo*. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo assim, dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes. Outras características importantes dos óleos essenciais são: aroma agradável e intenso, sabor geralmente picante, geralmente incolores ou levemente amarelos, instáveis principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, solúveis em solventes orgânicos e solubilidade limitada em água (Simões, 2007).

Diferentemente dos metabólitos primários, tais como clorofila, amino ácidos, nucleotídeos, carboidratos simples e membranas lipídicas, os metabólitos secundários entre, eles os óleos essenciais, geralmente não tem papel reconhecido nos processos de fotossíntese, respiração, transporte, assimilação de nutrientes e diferenciação. Metabólitos secundários também se diferenciam dos metabólitos primários por terem uma distribuição restrita no reino vegetal. Isto é, metabólitos secundários específicos são encontrados em apenas uma espécie de planta ou um grupo de espécies taxonomicamente relacionadas, ao passo que os metabólitos primários básicos são encontrados por todo o reino vegetal (Taiz & Zeiger, 2002).

Metabólitos secundários de plantas podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio. Terpenos, os quais são os principais constituintes dos óleos essenciais, são sintetizados a partir da rota do ácido mevalônico ou de intermediários básicos da glicólise (Rota MEP), conforme esquematizado na figura 1. Compostos fenólicos são substâncias com caráter aromático formadas através do ácido chiquímico ou do ácido malônico. Os produtos secundários contendo nitrogênio, tais quais alcalóides, são biossintetizados primariamente de amino ácidos (Taiz & Zeiger, 2002).

Os óleos essenciais das plantas foram considerados por muito tempo como “desperdício fisiológico” (Knobloch et al., 1986), ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário (Mothes, 1980). Atualmente, é atribuída aos óleos essenciais a existência

de funções ecológicas assim como fisiológicas, tais como inibir o crescimento de plantas competitivas (alelopatia), proteger as plantas para que não sejam comidas por herbívoros, proteger a planta contra a perda de água e controle da temperatura. Os óleos essenciais também têm se mostrado eficientes na atração de insetos polinizadores (Craveiro & Machado, 1986; Harborne, 1993).

Químicos do final do século dezanove se interessaram no estudo dos óleos essenciais por causa de seu potencial medicinal e industrial (Taiz & Zeiger, 2002). Comercialmente, estes óleos são importantes devido à utilização crescente nas indústrias farmacêutica, de alimentos, e de cosméticos (Simões, 2007; Taiz & Zeiger, 2002).

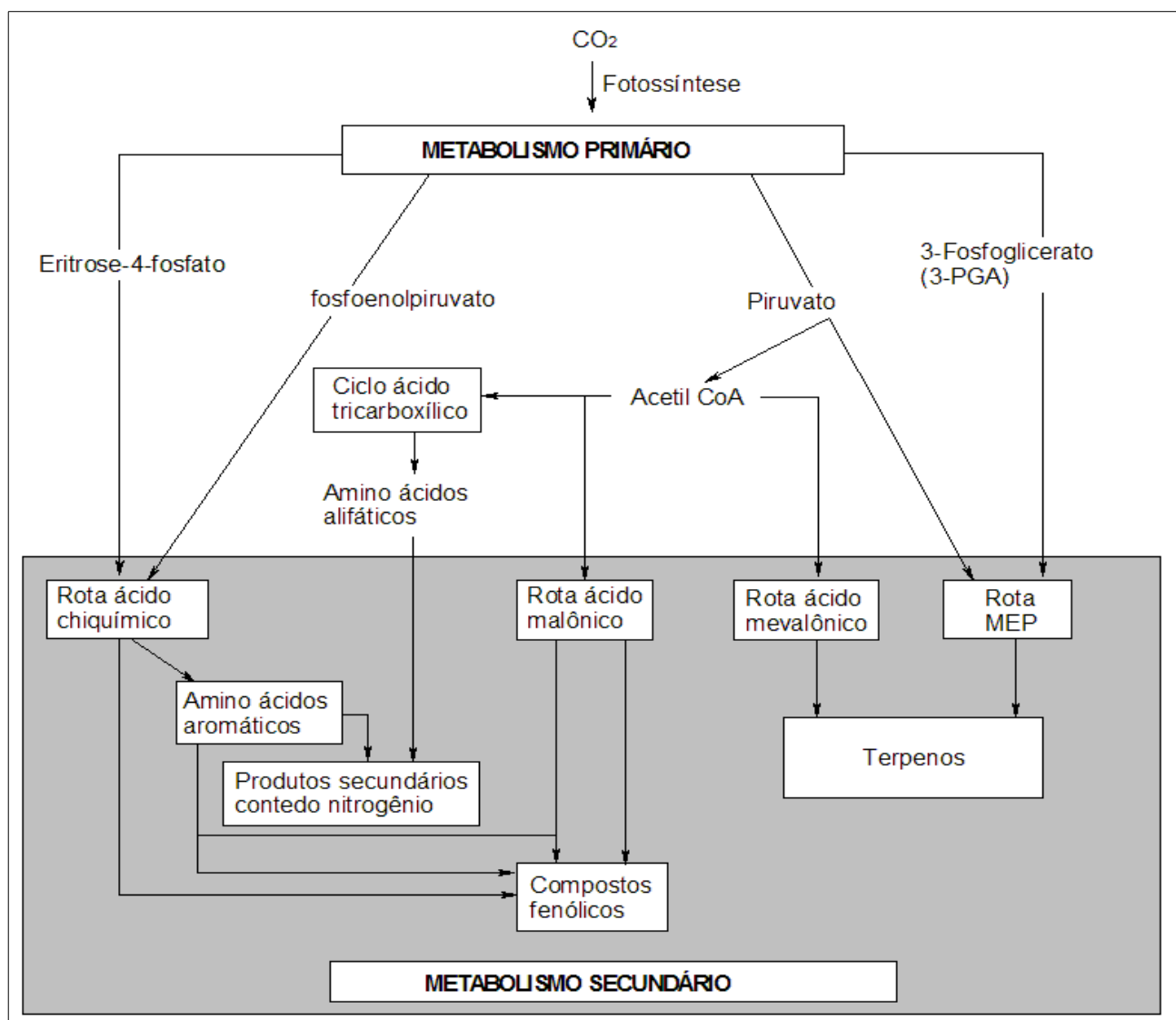
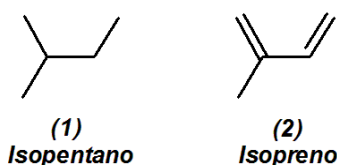


Figura 1. Esquema simplificado da principal rota de biossíntese de metabólitos-secundários e suas interações com o metabolismo primário.

2-1-1. Composição dos Óleos Essenciais

Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que esses últimos preponderam (Simões, 2007).

Todos os terpenos são derivados do agrupamento de unidades com cinco carbonos que apresentam a forma estrutural do isopentano (1). Assim, terpenos são definidos como um grupo único de produtos naturais baseados em hidrocarbonetos, possuindo uma estrutura que hipoteticamente poderia ser derivada do isopreno (2), fornecendo a base para estruturas que poderiam ser divididas em unidades de isopentano (Cseke et al., 2006):



Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de C_5 que eles contém. Embora devido às extensivas modificações metabólicas às vezes é difícil encontrar os resíduos originais de C_5 . Assim, terpenos com cinco carbonos (C_5) são chamados **hemiterpenos**, terpenos com dez carbonos (duas unidades C_5) são chamados **monoterpenos**, terpenos com 15 carbonos (três unidades C_5) são chamados **sesquiterpenos** e terpenos com 20 carbonos (quatro unidades C_5) são **diterpenos**. Terpenos maiores incluem **triterpenos** (30 carbonos), **tetraterpenos** (quarenta carbonos), e **politerpenóides** ($[C_5]_n$ onde $n > 10$) (Taiz & Zeiger, 2002).

Como todos os produtos naturais, dentro desta classificação simplista se encontra uma enorme diversidade estrutural que resulta numa grande variedade de compostos semelhantes aos terpenos (terpenóides). Algo como 30.000 terpenóides já foram identificados (Sacchetini & Poulter, 1997).

Mono e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas chamadas de óleos essenciais (Simões, 2007).

Monoterpenos: C_{10}

Existe na natureza uma interessante variedade de arranjos para decanos baseados na estrutura do isopreno. Os monoterpenóides são os principais componentes de muitos óleos essenciais e, tal qual, têm importância econômica como aromatizantes e perfumes. Exemplos acíclicos comuns incluem geraniol (3), lavandulol (4), mirceno (5), perileno (6) e linalol (7). Estruturas cíclicas

incluem muitos compostos bem conhecidos como carvona (**8**), 3-careno (**9**), α -pineno (**10**), mentol (**11**), cânfora (**12**), safranól (**13**), eucaliptol (**14**) e β -tujona (**15**). As estruturas destes compostos monoterpênicos são mostradas na figura 2 (Cseke et al., 2006).

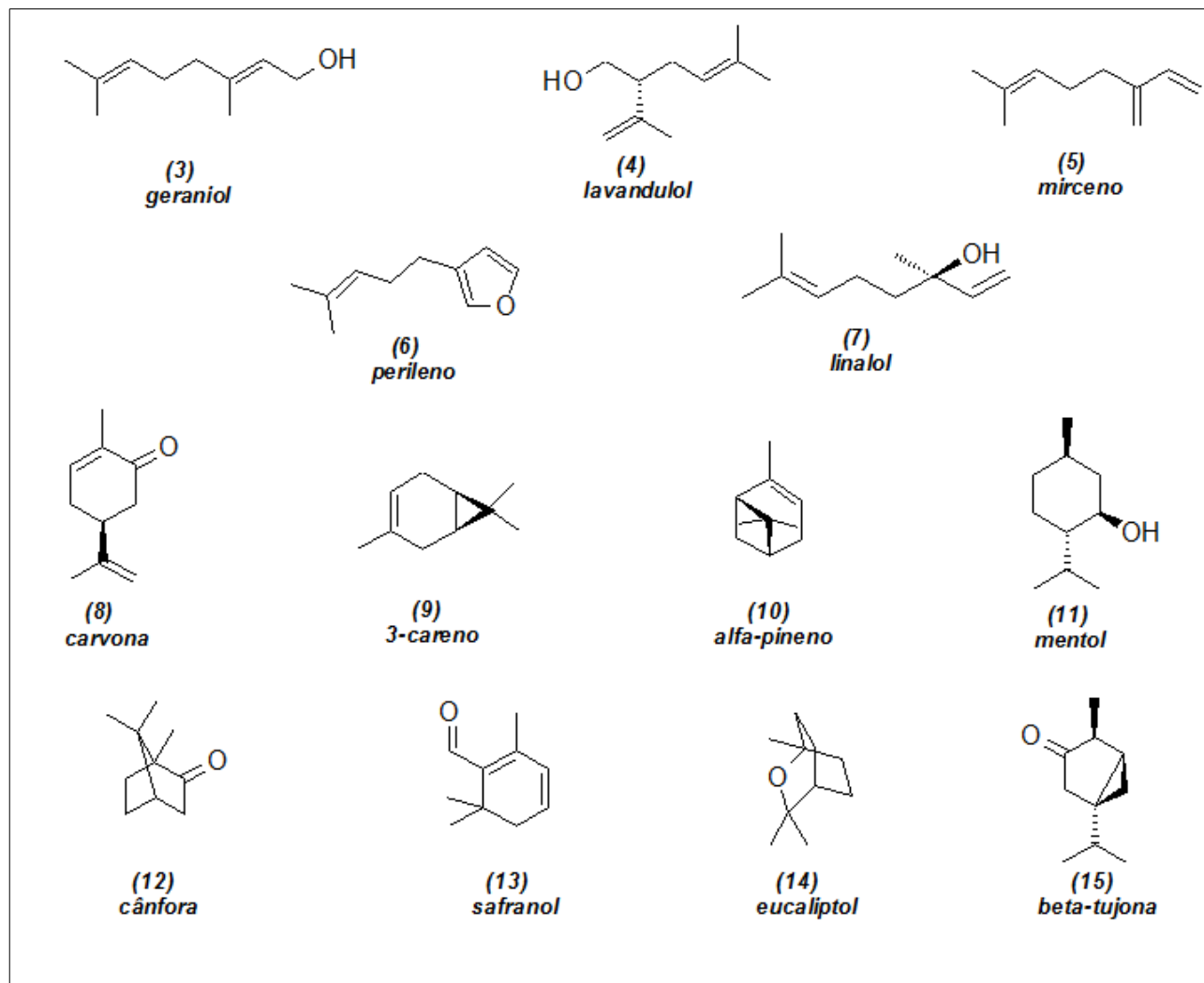


Figura 2. Exemplos de monoterpênicos.

Muitos dos monoterpênicos ilustrados na figura 2 vêm de fontes das quais a maioria de nós somos familiares. Mirceno (**5**) é encontrado no óleo essencial das folhas de louro (*Laurus nobilis*) assim como de lúpulo (*Humulus lupulus*). Ele é usado como um intermediário na fabricação de perfumes (Opdyke, 1987). Geraniol (**3**), o qual é isômero do linalol (**7**), constitui a maior parte do óleo do gerânio (*Pelargonium graveolens*) e também é encontrado no óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*) (Temple et al., 1991), capim limão (*Cymbopogon citratus* ou *C. flexuosus*), e outros. Lavandulol (**4**) é um dos principais ingredientes do óleo da lavanda (*Lavandula angustifolia*), geralmente usada em perfumes masculinos (Shellie et al., 2002). Perileno (**6**) pode ser encontrado na hortelã-púrpura (*Perilla frutescens*), nativa do sul e do oriente da Ásia (Yuba et al., 1995). Mentol (**11**) é um monoterpêneo bastante conhecido que é encontrado no óleo essencial da

hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e outros membros da família (Lamiaceae). Carvona (**8**) é um monoterpeno comum, um dos principais componentes olfatórios do cominho (*Carum carvi*) e apresenta atividade fungicida (McGeady et al., 2002). O 3-careno (**9**) é um monoterpeno que possui o anel ciclopropano, derivados dele têm demonstrado atividade anestésica (Librowski et al., 2004). O principal ingrediente do óleo de terebentina, α -Pineno (**10**), provavelmente tem um papel significativo na atividade de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos na natureza (Trudgill, 1994). Linalol (**7**) é um dos principais constituintes do coentro (*Coriandrum sativum*) (Gil et al., 2002). Ele é também um dos compostos com essência floral mais comum encontrado nas plantas em floração, e é um composto aromatizante em vários chás (Dudareva et al., 1996). Safranól (**13**) é o maior responsável pelo característico odor do açafrão (*Crocus sativus*) (Kanakakis et al., 2004). Eucaliptol (1,8-cineol) (**14**) é o principal componente do óleo essencial das folhas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Eucaliptol assim como cânfora, formam os principais constituintes do óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.) (Kovar et al., 1987). Pesquisas recentes mostraram que eucaliptol é eficiente na redução de inflamações e dores assim como promove a morte de células leucêmicas (Moteki et al., 2002)

Sesquiterpenos: C₁₅

Compostos por três unidades de isopreno, os sesquiterpenos C₁₅ existem em agrupamentos acíclicos e cíclicos. Um membro importante desta série é o farnesol difosfato, um intermediário chave na biossíntese de terpenóides. Farnesol tem demonstrado atividade preventiva ao câncer (Crowell & Gould, 2004). Alguns exemplos dos sesquiterpenos mais comuns são mostrados na figura 3 como: α -bisaboleno (**16**), lanceol (**17**), perezona (**18**), humuleno (**19**), alfa-cadideno (**20**), guaiol (**21**), cedrol (**22**), cariofileno (**23**), santonina (**24**), helenalina (**25**), acorone (**26**) e ácido abscísico (**27**).

Santonina (**24**) é um anti-helmíntico que é isolado da santônica (*Artemisia maritima*). Cariofileno (**23**) é um dos principais componentes do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*). Acorone (**26**) é um sesquiterpeno dicetônico presente no óleo essencial do cálamus (*Acorus calamus*) (Mazza, 1985). Helenalina (**25**) é uma das muitas lactonas sesquiterpênicas isoladas do óleo da arnica (*Arnica montana*). Recentemente demonstrou-se atividade tripanossomicida para esta lactona (Hoet et al., 2004; Schmidt et al., 2002).

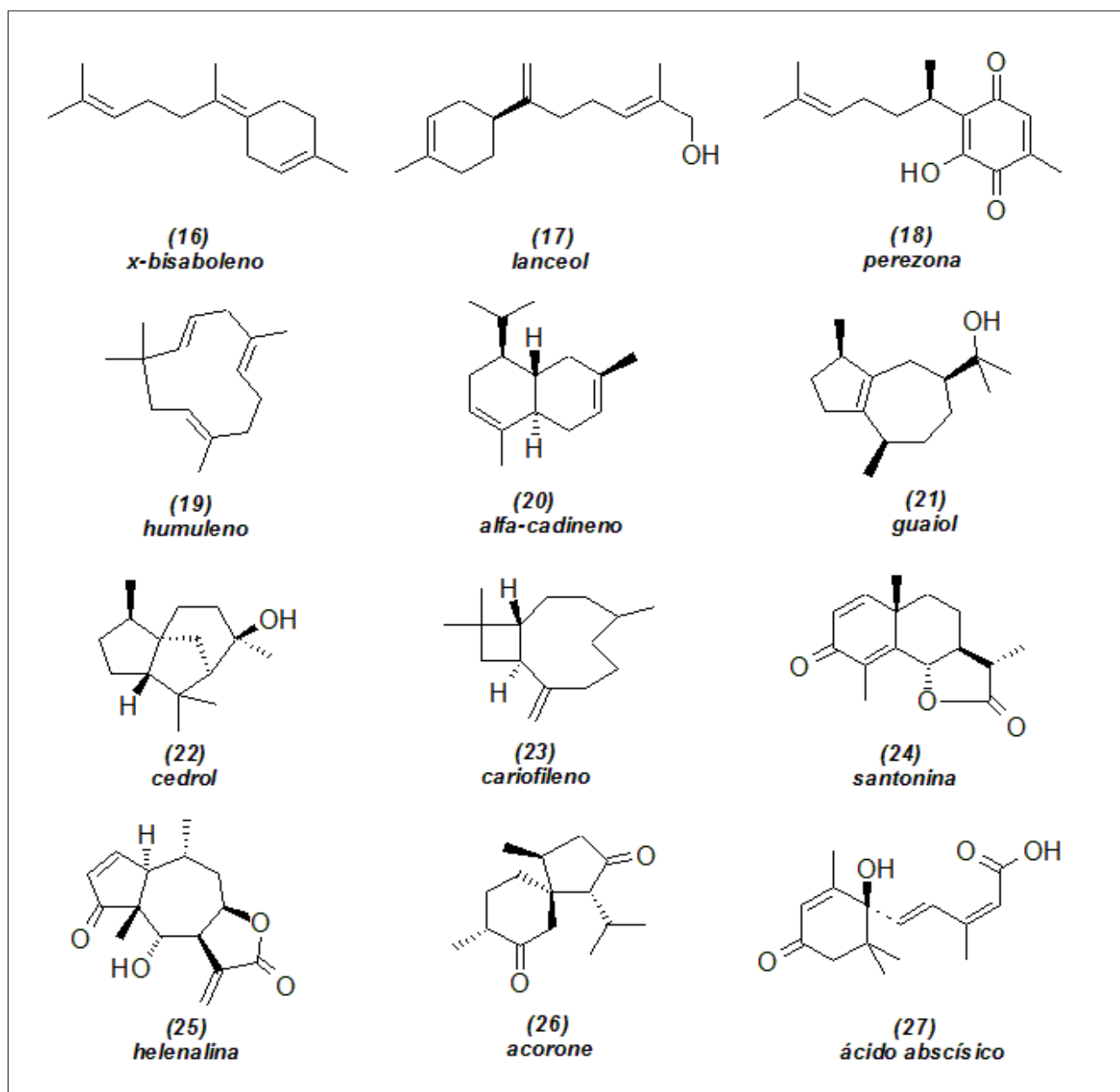


Figura 3: Exemplos de sesquiterpenos.

2-1-2. Biossíntese de Óleos Essenciais

A rota biossintética considerada atualmente para os terpenos não é muito simples. Conforme demonstrado na figura 4, duas diferentes rotas biossintéticas produzem o principal bloco construtor de terpenos, o isopentenil difosfato (IPP). A primeira rota biossintética é conhecida como rota AMV (ácido mevalônico), e a segunda é referida como rota MEP (metileritritol fosfato) (Dewick, 1997).

Na bem estudada rota do ácido mevalônico (AMV) três moléculas de acetil CoA se combinam para formar o ácido mevalônico. Esse intermediário chave de seis carbonos é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para formar o isopentenil difosfato (IPP) que eventualmente se converte em seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) (Dewick, 1997).

Na segunda rota biossintética, denominada rota do metileritritol fosfato (MEP), uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbonos derivados do piruvato aparentemente se combinam para formar um intermediário, dimetilalil difosfato (DMAPP), que eventualmente se converte em seu isômero isopentenil difosfato (IPP) (Dewick, 1997). Isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) são as unidades básicas ativadas de C₅ na biossíntese de terpenos que se juntam para formar moléculas maiores. Primeiramente, IPP e DMAPP reagem para gerar geranyl difosfato (GPP), o C₁₀ precursor de quase todos os monoterpenos. GPP pode então se unir à outra molécula de IPP para formar o composto C₁₅ farnesil difosfato (FPP), o precursor de quase todos os sesquiterpenos (Dewick, 1997).

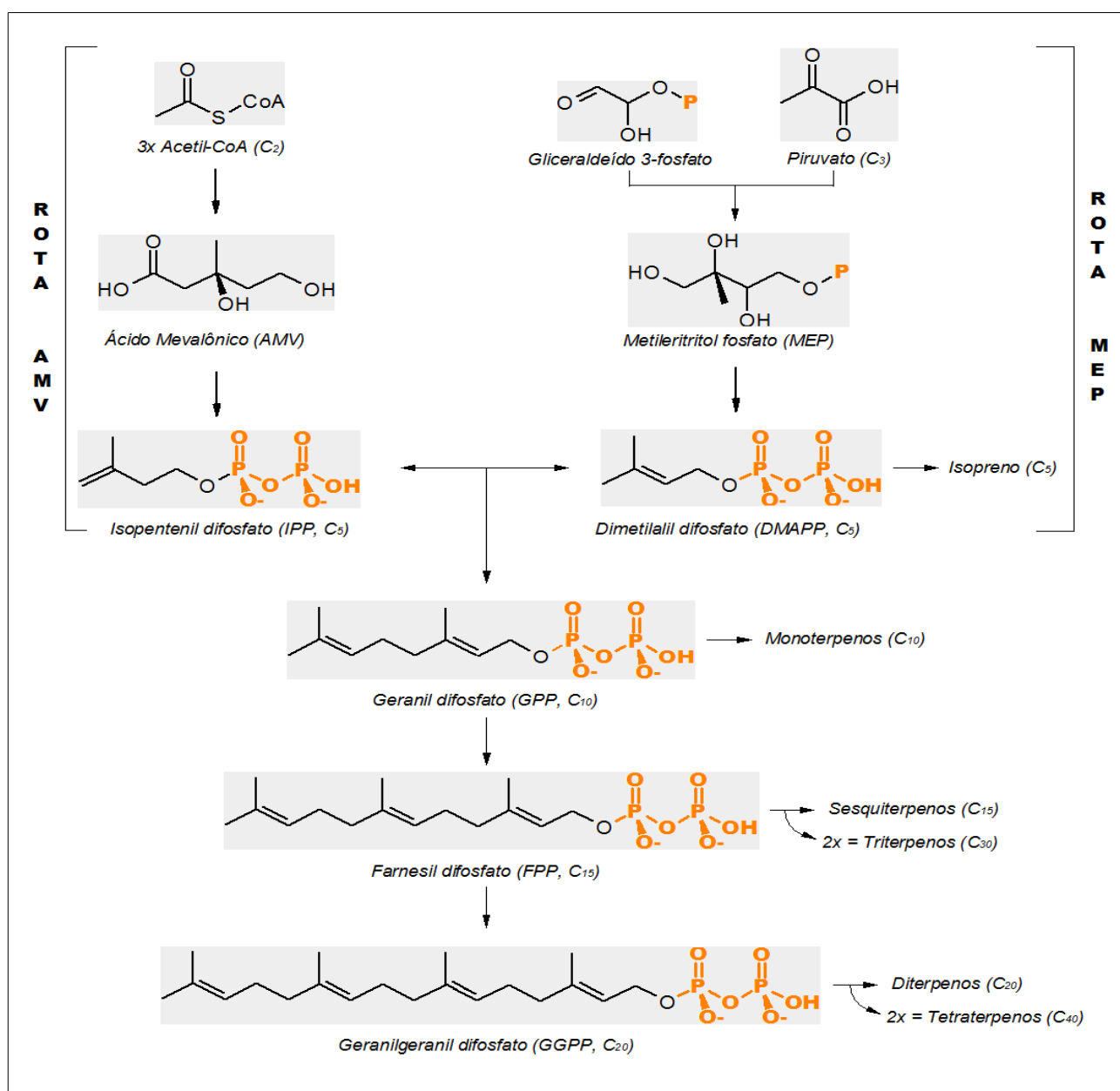


Figura 4. Esboço da biossíntese de terpenos. A unidade básica C₅ dos terpenos é sintetizada por duas rotas diferentes. Os intermediários fosforilados, IPP e DMAPP, se combinam para formar C₁₀, C₁₅ e outros terpenos maiores.

Foi demonstrado por Croteau & Winters (1982) na Universidade do Estado de Washington que as folhas podem sintetizar uma variedade de monoterpenos à partir de geranil pirofostato (GPP). A figura 5 mostra uma foto, obtida com um microscópio eletrônico, da glândula capilar de uma folha jovem de um girassol (*Balsamorhiza sagittata*). Supõe-se que os terpenos sejam sintetizados nas células capilares e armazenados na parte arredondada do topo. Esta “parte arredondada” é um espaço extracelular que se forma quando a cutícula e uma porção da parede celular se projetam para fora do restante da célula.

Monoterpenos, assim como, alguns sesquiterpenos, em geral, servem como agentes repelentes que tem significativa toxicidade contra insetos mas toxicidade negligenciável para mamíferos. Misturas destes compostos voláteis de baixo peso molecular, denominados óleos essenciais, são os compostos que fornecem às plantas, como hortelã pimenta (*Mentha piperita*), limão (*Citrus limon*), basílico (*Ocimum basilicum*), e sálvia (*Salvia officinalis*), seus característicos odores, e são comercialmente importantes na aromatização de alimentos e na produção de perfumes (Cseke et al., 2006).

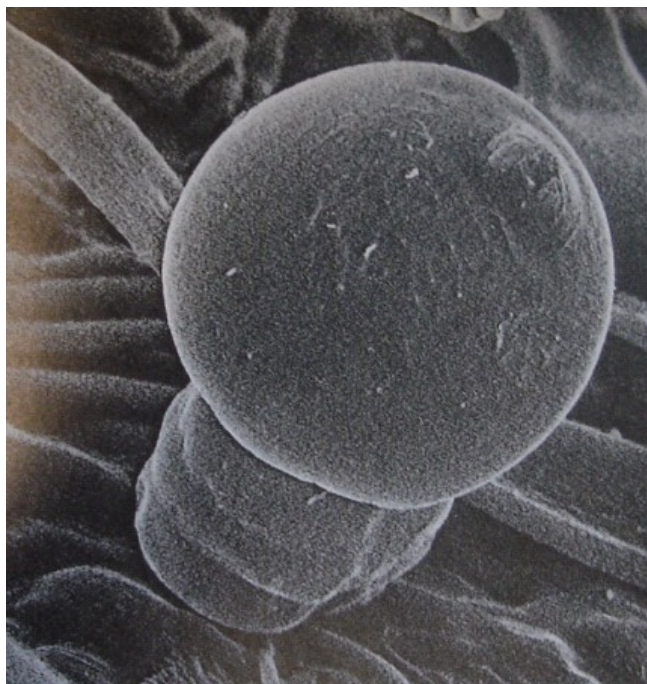


Figura 5. Foto de uma glândula capilar de uma folha jovem de girassol (*Balsamorhiza sagittata*). (x1105) (J.N.A. Lott/Biological Photo Service)

2-1-3. Extração e Armazenamento de Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos de certas variedades de árvores, arbustos, ervas, gramíneas, e flores. O óleo é concentrado em diferentes partes da planta, podendo ser encontrado no caule, nas

folhas, nas pétalas ou nas cascas das frutas. Eles podem ser extraídos das plantas por vários métodos, dependendo da espécie em particular. O método mais comum é a destilação por arraste a vapor, embora existam outros métodos importantes como extração com solvente, enfloração, maceração e extração com fluido supercrítico. Geralmente o rendimento de um óleo essencial é baixo, sendo que uma grande quantidade de material vegetal é necessária para produzir poucos mililitros de óleo.

A destilação por arraste a vapor é uma destilação de misturas imiscíveis de compostos orgânicos e água (vapor). Misturas imiscíveis não se comportam como soluções. Os componentes de uma mistura imiscível “fervem” a temperaturas menores do que os pontos de ebulição dos compostos individuais. Assim, uma mistura de compostos de alto ponto de ebulição e água pode ser destilada à temperatura menor do que 100 °C, que é o ponto de ebulição da água. O princípio da destilação por arraste a vapor baseia-se no fato de que a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é igual a soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais. A pressão total de vapor da mistura torna-se igual a pressão atmosférica, e a mistura ferve numa temperatura menor que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes (Godefroot et al., 1981).

Tanto na condução do processo de destilação quanto na elaboração de projetos de equipamentos para a extração de óleos essenciais, seja em escala laboratorial ou industrial, estes fundamentos teóricos são necessários. Uma das principais propriedades físicas utilizadas nos projetos de extratores é a densidade do óleo essencial a ser extraído, se mais ou menos densos que a água, em temperaturas que variam de 5 °C a 50 °C. Com base nessa propriedade, existem vários tipos de sistemas extratores de óleos essenciais, mas o sistema Clevenger (Figura 6) é o mais conhecido e utilizado em escala laboratorial, podendo operar em circuito aberto ou fechado. Na destilação tipo Clevenger a matriz da qual se quer extrair o óleo é imersa em água. O aquecimento até a fervura provoca a formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis. Após condensação, estes compostos separam-se da água por decantação. Na destilação o material é sujeito a temperaturas próximas dos 100 °C, o que poderá levar a decomposição dos constituintes termolábeis. O aquecimento prolongado em contato com a água, poderá conduzir à hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou decomposição de outros compostos (Godefroot et al., 1981).

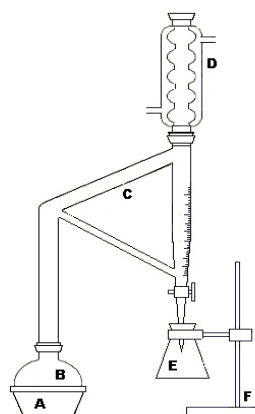


Figura 6. Aparelho de Clevenger: (A)manta aquecedora, (B)Balão de 1 L, (C)Vidraria de Clevenger, (D)Condensador, (E)Erlenmeyer e (F)Suporte universal.

Armazenamento é uma questão importante no que se refere à óleos essenciais. Eles devem ser guardados em frascos marrons ou de cores escuras, protegidos da luz, calor, e umidade. O frasco deve ser mantido bem fechado quando o óleo não estiver sendo utilizado (Dodt, 1996).

2-1-4. Caracterização de Óleos Essenciais

Na química dos óleos essenciais, o grande desafio é elucidar as estruturas dos constituintes do óleo essencial de interesse (Cseke et al., 2006). Em média, um óleo essencial contém uns cem componentes. Os principais são hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis. Embora a tecnologia tenha permitido identificar mais compostos, ainda existem muitos para serem elucidados (Dodt, 1996). Existem vários métodos que podem ser usados para realizar a avaliação da qualidade dos óleos essenciais. Esses métodos podem ser classificados em organolépticos, físicos, químicos ou físico-químicos. As opções dependem do tipo e quantidade da amostra, do rigor analítico requerido e da infra-estrutura laboratorial disponível (Simões, 2007). A ferramenta mais importante para a elucidação de estruturas dos componentes dos óleos essenciais é a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) (Cseke et al., 2006).

2-1-5. Métodos Cromatográficos de Análise

A cromatografia gasosa é o método de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de óleos essenciais. Como os óleos são suficientemente voláteis, a amostra é solubilizada em solventes orgânicos como hexano, antes de ser injetada no cromatógrafo (Kitson et al., 1996). A identificação dos compostos individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões. Para ser mais independente das variações do tempo de retenção, sob condições diferentes de medida, foi introduzido o índice de retenção de Kovats (IK)

que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Tais índices permitem uma comparação melhor dos dados entre laboratórios diferentes. Os valores de IK se encontram entre 900 (volátil) e 1900 (menos volátil). Um valor de 950 significa que a substância está eluindo entre nonano (IK=900) e decano (IK=1000) (Kitson et al., 1996).

Para ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, a combinação de cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (EM) para a detecção e identificação dos componentes de óleos essenciais têm se tornado uma ferramenta poderosa em análises fitoquímicas. A cromatografia gasosa separa os componentes de uma mistura num intervalo de tempo, e a espectrometria de massa fornece um espectro de massas para cada pico. O espectro de massas geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. A massa molecular já informa sobre a classe de substância (p.ex. m/z 136 monoterpénóides com $C_{10}H_{16}$). O padrão de fragmentação pode ser comparado com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas, que normalmente é instalada no computador. Ainda assim, é comum que sobre alguns picos que não podem ser identificados. A amostra a ser analisada é injetada dentro da CG, onde é varrida através da coluna capilar por uma corrente de gás inerte. Os componentes da amostra são separados baseados em suas diferentes interações adsorptivas com a fase estacionária (apolar) da coluna cromatográfica. Os compostos separados, então, passam individualmente através do espectrômetro de massas, onde ionização, fragmentação e detecção de massas ocorrem. A combinação CG-EM permite a separação dos componentes dos óleos essenciais e a aquisição do espectro de massas dos componentes separados. Utilização dos dados de retenção da CG juntamente com a fragmentação EM e comparação com bibliotecas espectrais permite a identificação de compostos (Kitson et al., 1996).

2-1-6. Controle da Identidade e da Pureza

Para avaliar a qualidade de um óleo volátil, de uma matéria-prima vegetal rica em óleo volátil, de um cosmético ou de um medicamento que contenha óleo volátil, é necessário dispor de informações analíticas sobre a identidade e a pureza do material em questão. Se os valores medidos encontram-se na faixa dos dados da literatura, é possível que o material analisado seja o óleo essencial de interesse. Porém, é importante salientar que em certos casos de falsificação, esta não pode ser detectada somente com métodos que forneçam informações básicas. Para certificar-se dessa identidade, outros métodos devem ser utilizados, além da cromatografia gasosa (Simões, 2007).

O índice de refração $[\eta]_D^{20}$ fornece informação analítica sobre a identidade e pureza do óleo essencial, os valores devem estar entre 1.450 e 1.590 e cada óleo possui um valor característico. A

rotação óptica $[\alpha]_D^{20}$ também fornece informação analítica sobre a identidade e pureza do óleo essencial, os valores preconizados pelas farmacopéias são relativamente grandes, por exemplo, óleo de eucalipto: $[\alpha]_D^{20}$ entre 0 e 10; óleo de menta: entre 16 e 30. Densidade relativa $[d]^{20}$ em relação a água é mais um indicador de pureza para óleos essenciais, os valores encontram-se geralmente entre 0,69 e 1,118 e são característicos para cada óleo (Simões, 2007).

2-2. Espécie Vegetal *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

A *Lippia alba* é uma planta de aroma forte e agradável, nativa de quase todo o território brasileiro, conhecida popularmente por diversas designações, especialmente como erva-cidreira. A literatura etnofarmacológica registra o uso do chá de erva-cidreira em todo o Brasil, tanto por seu sabor agradável como pela ação calmante atribuída pela medicina tradicional brasileira. Como resultado de várias análises morfológicas e químicas, foi possível determinar a existência de três quimiotipos para a espécie: o primeiro quimiotipo foi caracterizado por teores elevados de **citral e mirceno** no óleo essencial, o segundo quimiotipo foi caracterizado por teores elevados de **citral e limoneno** e o terceiro quimiotipo caracterizado contém altos teores de **carvona e limoneno**. Depois desse estudo químico, o uso do chá preparado com suas folhas tem sido orientado conforme os quimiotipos acima descritos. O chá das folhas dos dois primeiros quimiotipos tem ação calmante e espasmolítica suaves atribuídas à presença do citral e atividade analgésica devida ao mirceno, o chá das folhas do segundo quimiotipo, além destas ações tem forte atividade sedativa e ansiolítica, enquanto o chá das folhas do terceiro quimiotipo tem atividade principalmente mucolítica, isto é, seu uso contribui para tornar mais fluidas as secreções dos brônquios, facilitando a expectoração. Além de ser saboroso e aromático, o chá preparado com as folhas dos dois quimiotipos ricos em citral, é eficaz no alívio de pequenas crises de cólicas uterinas e intestinais, bem como no tratamento do nervosismo e estados de intranquilidade (Lorenzi & Matos, 2002).

De acordo com Joly (1993) esta espécie vegetal foi classificada como:

Reino: Plantae

Ordem: Lamiales

Família: Verbenaceae

Gênero: *Lippia*

Espécie: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

A família Verbenaceae compreende 100 gêneros com aproximadamente 2.600 espécies de distribuição pantropical e somente um número limitado de espécies ocorre em regiões temperadas.

São plantas em geral herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas cruzadas, inteiras e em geral com cheiro intenso. Flores pequenas, reunidas em densas inflorescências quase sempre axilares. Muitos gêneros são conhecidos no Brasil (*Vitex*, *Lantana*, *Stachytarpheta*, *Lippia*, entre outros), alguns nativos, outros adaptados. Dentre as Verbenaceae existem diversos exemplos de plantas que são medicinais. (Joly, 1993).

O gênero *Lippia* reúne cerca de 200 espécies (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Br., *Lippia chamissonis* D. Dietr., *Lippia florida* Cham., *Lippia herbacea* Mart., *Lippia nodiflora* var. *Nodiflora*, *Lippia substrigosa* Turcz., entre outras) com distribuição pantropical. O maior número de espécies se encontra no Brasil, cerca de 150, com ocorrência especialmente nos campos rupestres e cerrados (Joly, 1993).

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é um subarbusto de morfologia variável, alcançando até um metro e meio da altura, raramente dois metros, nativa de quase todo o território brasileiro. Seus ramos são finos, esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços. As folhas são inteiras, opostas, de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. Flores azul-arroxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (Figura 7) (McHoy & Westland, 1994; Vieira & Albuquerque, 1998).

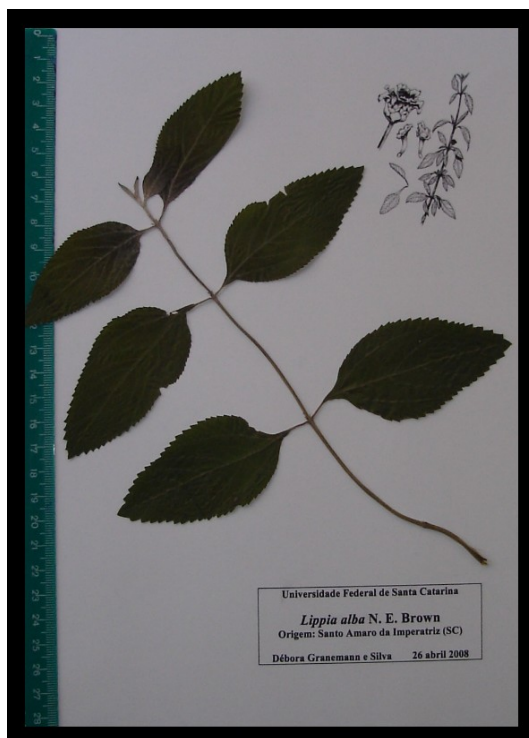


Figura 7. Espécie vegetal *Lippia alba* N. E. Brown.

Pascual e colaboradores (2001) fizeram uma revisão etnofarmacológica do uso tradicional na América Central, América do Sul e África de 52 espécies de *Lippia*, incluindo a *Lippia alba*. Foi observado na literatura disponível que a maioria das espécies eram usadas no tratamento de desordem gastrointestinal, respiratória e como temperos. Segundo estes pesquisadores, o estudo desta espécie demonstrou ainda resultados positivos como sedativo e antiinflamatório, no tratamento de doenças cutâneas e respiratórias, desordem gastrointestinal e menstrual, no tratamento de sífilis e gonorréia.

Em um outro estudo etnofarmacológico da espécie *Lippia alba*, Oliveira e colaboradores (2006) investigaram a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial com objetivo de correlacionar com as aplicações tradicionais. Foi constatada atividade antimicrobiana do óleo essencial contra todos os organismos testados (entre eles o microrganismo *Staphylococcus aureus*) e o uso correlacionado em maior proporção como sedativo. A análise química possibilitou a identificação da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown como sendo do quimiotipo citral-mirceno.

Alguns resultados apontaram atividade de proteção contra infecções proporcionada pelo óleo essencial da *Lippia alba* (Hennebelle et al., 2008). A atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e a inibição *in vitro* da peroxidação lipídica na espécie *Lippia alba* demonstrou $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ na redução do radical DPPH e $IC_{50} < 32 \mu\text{g/mL}$ na inibição *in vitro* da peroxidação lipídica (Ramos et al., 2003). Testes com ratos demonstraram que citral, limoneno e mirceno, constituintes do óleo essencial de diferentes quimiotipos da *Lippia alba*, apresentam efeitos sedativos e de indução ao aumento no tempo de sono, sendo que o efeito mais intenso foi atribuído ao citral (Gurgel do Vale et al., 2002). O óleo essencial da *Lippia alba* apresentou atividade contra *Candida albicans* em estudo feito com um grupo de plantas medicinais brasileiras. Análises químicas do óleo essencial destas plantas mostraram a presença de compostos com conhecida atividade antimicrobiana, incluindo 1,8-cineole, geranial, germacreno-D, limoneno, linalool e mentol (Duarte et al., 2005). A extração do óleo essencial da *Lippia alba*, de origem colombiana, através da destilação por arraste à vapor do tipo Clevenger demonstrou a presença de carvona (40-57%) como o componente mais abundante, seguido por limoneno (24-37%), biciclosesquihellandreno (5-22%), piperitenona (1-2%), piperitona (ca. 1%), e β -bourboneno (0,6-1,5%) (Stashenko, 2004).

Estes resultados motivaram o estudo do tema proposto neste trabalho, análise química dos componentes do óleo essencial da *Lippia alba* seguida da investigação de atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3-1. Objetivos Gerais

Contribuindo para a consolidação da linha de pesquisa em produtos de origem vegetal, este trabalho de conclusão de curso visa o estudo da composição química do óleo essencial da espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown com posterior aplicação deste óleo em testes biológicos.

3-2. Objetivos Específicos

- i. Extrair o óleo essencial das folhas e talos da *Lippia alba*, empregando para tanto a técnica de destilação por arraste à vapor;
- ii. Estudar as propriedades físico-químicas do óleo essencial através do índice de refração, da rotação óptica e determinação do rendimento;
- iii. Determinar a composição química do óleo essencial utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- iv. Determinar a toxicidade frente a *A. Salina*, a atividade antimicrobiana frente a três microrganismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e determinar a atividade antioxidante do óleo essencial da *Lippia alba*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4-1. Material Vegetal

O material vegetal foi colhido de forma manual, armazenado em caixas de papel (Figura 8) e levado para o laboratório onde ficou estocado por um período de no máximo 24 hs, até que a extração do óleo essencial fosse realizada.



Figura 8. Folhas de Lippia alba recém colhidas

4-2. Método de extração e armazenamento

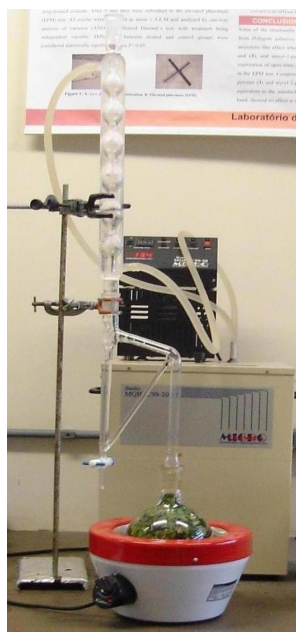


Figura 9. Destilação por arraste à vapor com aparelho de Clevenger

O material vegetal foi picado com tesoura de forma a aumentar a superfície de contato. A técnica empregada para a extração do óleo essencial foi a destilação por arraste à vapor com aparelho de Clevenger (Figura 9), realizada segundo métodos convencionais. Foi usada água refrigerada (5 °C) para condensação dos vapores. O tempo de destilação variou de 2 a 3 horas. Para a separação do óleo essencial obtido pela destilação por arraste à vapor foi utilizado éter etílico. A solução resultante foi transferida para um béquer pequeno, tratada com agente dessecante sulfato de magnésio e posterior decantação. Em seguida foi aplicada ventilação fria sobre o béquer para evaporar o éter etílico e deixar apenas o óleo essencial.

O óleo essencial obtido foi armazenado em pequenos recipientes de vidro âmbar (Figura 10) sob refrigeração seca (-18 °C) e ao abrigo da luz até a realização das análises e ensaios.



Figura 10. Óleo essencial em vidro âmbar

4-3. Análise dos Óleos Essenciais

4-3-1. Propriedades Físico-Químicas

O índice de refração do óleo essencial da *L. alba* foi observado através de refratômetro modelo Jera, fabricante Carl Zeiss e o valor observado foi comparado com valores da literatura.

O estudo do comportamento do óleo essencial da *Lippia alba* em relação à luz plano polarizada foi realizado no aparelho Polartronic E, do fabricante Schmidt Haensch e contribuiu para a avaliação das propriedades físico-químicas. Uma amostra do óleo essencial foi dissolvida em etanol para a determinação da atividade óptica. Uma medida com o solvente puro foi realizada previamente para que não houvesse influência do etanol nos resultados obtidos.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Síntese e Biocatálise na Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação da prof^a. Dr^a. M^a da Graça Nascimento.

4-3-2. Análise Cromatográfica por CG

Amostras puras (1 µL) de óleo essencial da *Lippia alba* foram submetidas à cromatografia gasosa, em cromatógrafo modelo Shimadzu GC-14B, coluna capilar CBLM-5 (30,0 m x 0,25mm d.i.), e detector de ionização de chamas. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio com vazão de 1 mL min⁻¹. A aquisição de sinais foi realizada por software em interface com o cromatógrafo. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a programação empregada foi a seguinte: 40 °C, aumentando 5 °C por minuto até 90 °C e então aumentando até 210 °C com uma taxa de 2 °C por minuto.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais na Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação da prof^a. Dr^a. Inês M^a Costa Brighente e do prof^o Dr^o Moacir G. Pizzolatti.

4-3-3. Análise Cromatográfica por CG-EM

Amostras puras (1 µL) de óleo essencial da *Lippia alba* foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, em cromatógrafo Shimadzu modelo GCMS-QP5050A, coluna capilar de sílica fundida 5% fenilpoli(dimetilsiloxano) (30,0 m x 0,25 mm d.i.). Como gás de arraste foi utilizado hélio com vazão de 1 mL min⁻¹. A aquisição de sinais foi realizada por software em interface com o cromatógrafo. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a programação empregada foi a seguinte: 40 °C (5 min), aumentando 5 °C por minuto até 90 °C e em seguida aumentando até 210 °C (5 min) com uma taxa de 2 °C por minuto. A faixa de massa atômica investigada foi de

25-400 u.m.a. A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos espectros de massa obtidos com os armazenados em biblioteca computadorizada, segundo banco de dados do cromatógrafo usado, em função de seus índices de retenção. A quantificação foi realizada segundo as áreas dos picos, embora se reconheça que este método não é muito confiável sem a aplicação de um índice de correção.

Estas análises e varreduras foram realizadas com a ajuda do aluno de doutorado Jacques P. Priebe no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do prof^o Dr^o Faruk J. N. Aguilera.

4-3-4. Índice de Retenção de Kovats

Os índices de retenção de Kovats foram determinados por injeção de uma solução contendo uma série homóloga de alcanos alifáticos (C₁₀-C₃₀) nas mesmas condições da amostra de óleo essencial descrita no item 4-3-2, aplicando a equação:

$$I = 100z + 100[(\log t'r_x - \log t'r_z) / (\log t'r_{(z+1)} - \log t'r_z)]$$

Onde:

z = número de carbonos do alcano anterior ao composto x;

t'r_x = tempo de retenção ajustado do composto x;

t'r_z = tempo de retenção ajustado do alcano anterior ao composto x;

t'r_(z+1) = tempo de retenção ajustado do alcano que aparece após o composto x;

4-3-5. Investigação da Toxicidade Usando Larvas de *A. salina* (TAS)

Para os bioensaios de letalidade da *A. salina*, utilizou-se a metodologia de Meyer *et al.* (1982), com pequenas modificações. O óleo essencial foi diluído em etanol a fim de obter concentrações de 100 a 1000 ppm. O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi água salgada (3,8 g de sal marinho para cada litro de água destilada). As larvas foram utilizadas nos ensaios 48 hs após a eclosão, em fase náupilo. Aproximadamente 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para cada um dos poços de uma placa com 24 poços, contendo 1 mL de salina e a substância a ser testada em diferentes concentrações: 100, 200, 300, 400, 500, 700, 800, 900 e 1000 ppm. Os testes foram feitos em triplicata. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 hs. A dose letal necessária para matar 50 % das larvas (DL₅₀) foi obtida através do gráfico da % de larvas mortas em função do logaritmo da dose testada.

4-3-6. Investigação da Atividade Antimicrobiana

Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio para a investigação da atividade antibacteriana do óleo essencial da *Lippia alba* seguiu o modelo de Souza e colaboradores (2005). Foram utilizadas três espécies de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. O óleo essencial da *Lippia alba* foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), com objetivo de se produzir soluções-mãe contendo 50 mg/mL. Posteriormente foi realizado diluições seriadas destas soluções em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), produzindo concentrações variando de 25 mg/mL a 1,5 µg/mL, distribuídas em volumes de 100 µL em cada micro poço da placa de micro diluição estéril. Em cada orifício teste foram adicionado 5 µL do inóculo bacteriano contendo 5×10^5 UFC/mL de cada microorganismo testado. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas incubadas em aerobiose a $36^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas. Após esta incubação inicial, adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio (5% v/v) em metanol, a cada micro cavidade da placa utilizada no experimento. Em seguida, realizou-se outra incubação em aerobiose por 30 minutos à temperatura de $36^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$, onde foi possível verificar a mudança de coloração para vermelho nos micro poços onde há presença de bactérias viáveis, ou seja, onde o óleo essencial não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM), foi determinada como sendo a concentração correspondente ao primeiro micro poço imediatamente anterior ao micro poço onde foi possível se verificar a presença da cor vermelha. Como controle da inibição bacteriana, foi utilizado o antibiótico gentamicina (Laboratório Chile, Santiago, Chile) cuja concentração inibitória mínima (CIM) contra os microorganismos testados deve estar entre 0,2 a 1,5 µg/mL, e como controle de crescimento e esterilidade foram utilizadas apenas as misturas do caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e DMSO com e sem adição da bactéria teste, respectivamente. A classificação para a atividade antimicrobiana de origem vegetal, baseada na CIM é a seguinte: inibição **forte** para CIM abaixo de 0,5 mg/mL, inibição **moderada** para CIM entre 0,5 e 1,5 mg/mL e inibição **fraca** para CIM acima de 1,5 mg/mL.

4-3-7. Investigação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical Livre DPPH (2,2-Difenil-picril-hidrazil)

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) foi baseado no método descrito por Cavin e colaboradores (1998), com algumas modificações. Uma solução de DPPH 0,004% (4 mg / 100 mL MeOH) foi adicionada à solução teste (óleo essencial) nas concentrações de 200 a 12,5 ppm. No espectrofotômetro UV-VIS (517 nm) e após 30 minutos, foi medida a absorbância da solução de DPPH (2 mL de solução 0,004%),

acrescentada de 1 mL de MeOH, obtendo-se assim a absorbância no tempo inicial (A_0). Para cada uma das concentrações da amostra em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorbância de cada amostra (A_i) nas diferentes concentrações. A absorbância de uma solução da amostra (1 mL) em metanol (2 mL), foi descontada da absorbância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência do óleo essencial nesse comprimento de onda. A análise foi feita em triplicata. Os valores obtidos foram graficados na forma de % de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da amostra teste. Com a utilização de um gráfico foi determinada 50% da atividade antioxidante, ou IC_{50} . A atividade antioxidante foi calculada pela fórmula $(A_0 - A_i / A_0) \times 100\%$ (eixo y do gráfico) em função das concentrações das amostras (eixo x).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o emprego da técnica de destilação por arraste a vapor foi constatado a presença de componentes voláteis na espécie *Lippia alba*. Os resultados das propriedades físico-químicas, da análise química por CG e por CG-EM e da atividade antimicrobiana do óleo essencial desta espécie são apresentados e discutidos abaixo.

5-1. Propriedades Físico-Químicas

A rotação óptica observada na amostra de óleo essencial da *Lippia alba* foi de $-0,12^\circ$. O índice de refração observado para esta mesma amostra foi de 1,473 ficando dentro da faixa prevista (1,450 – 1,590) e podendo ser considerado dentro das normas. O rendimento calculado foi de 1%.

5-2. Determinação da Composição do Óleo Essencial

Para a determinação do perfil químico do óleo essencial da espécie *Lippia alba* procedeu-se inicialmente a análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM). O resultado preliminar da caracterização por CG-EM foi comparado aos valores tabelados de índice de retenção de Kovats, pois a existência de espectros de massas muito parecidos para alguns isômeros pode equivocar a interpretação. Os valores do índice de retenção de Kovats calculados ficaram bem próximos, alguns se igualando aos encontrados na literatura. O cromatograma do óleo essencial obtido nesta análise é apresentado na figura 11.

A análise por CG-EM permitiu identificar que o óleo essencial da *Lippia alba* é composto em sua grande maioria por terpenos, dos quais 55,6% são monoterpenos, 38,9% são sesquiterpenos e apenas 5,6% destes são terpenos oxigenados. Embora o número de compostos seja alto, quatro compostos majoritários foram identificados: α -citral (43,1%), β -citral (25,1%), β -mirceno (5,8%) e germacreno-B (4,9%), que somados representam uma área total de 78,9%. Com base nesta composição ficou constatando que se trata de uma espécie com o quimiotipo **citral – mirceno**.

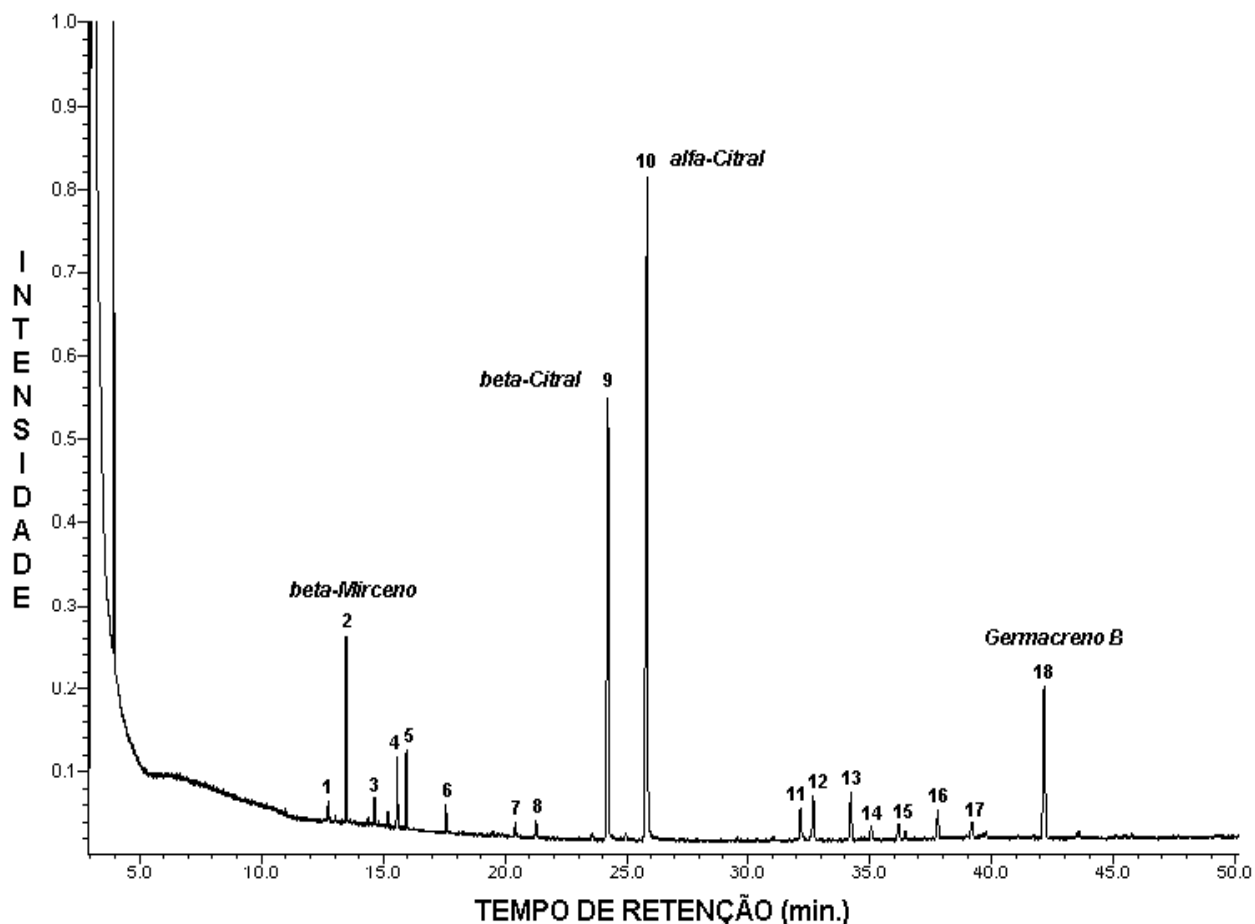


Figura 11. Cromatograma do óleo essencial da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brwon.

Os espectros de massas dos quatro compostos majoritários são apresentados nas figuras de 12 a 17. Os espectros de massas dos demais compostos estão no apêndice. Para todos os compostos identificados na amostra de óleo essencial da *Lippia alba*, foi feita uma comparação entre os espectros de massas obtidos da amostra (posicionados na parte **superior** das figuras) com os respectivos espectros de massas obtidos com padrões autênticos (posicionados na parte **inferior** das figuras) cujos dados estão publicados na literatura (Adams, 1999) e também disponíveis na biblioteca eletrônica NIST.

Algumas classes de compostos apresentam fragmentações características quando submetidas à análise de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas. O conhecimento dessas fragmentações pode facilitar um pouco o trabalho na hora de propor estruturas para compostos desconhecidos. Embora seja muito difícil caracterizar uma substância somente pela análise de seu espectro de massas, esta é de fundamental importância.

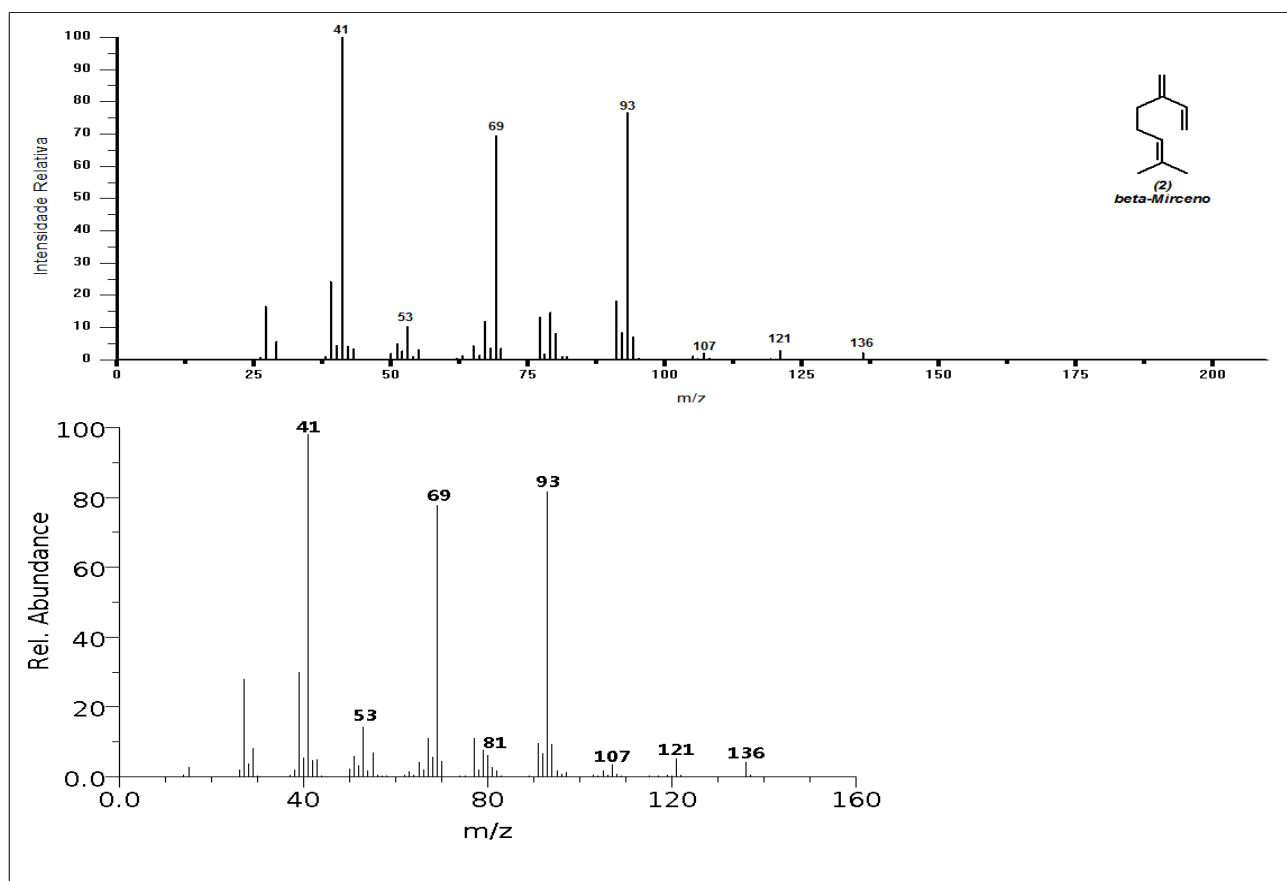


Figura 12. Espectros de massas do β -mirceno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).

Na figura 12, pode-se observar os espectros de massas do β -mirceno, um terpenóide classificado como monoterpene. O fragmento de massa m/z 136 refere-se ao íon molecular, pouco intenso devido à sua instabilidade. O pico em m/z 121 foi produzido pela perda de um radical metila (Figura 13). O pico em m/z 93 é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$ formada por isomerização (provocada pelo aumento de conjugação), seguida por clivagem alílica. Os picos em m/z 67 e 69 são fragmentos resultantes de clivagem bialílica. O pico base aparece em m/z 41 e sua formação deve envolver rearranjos.

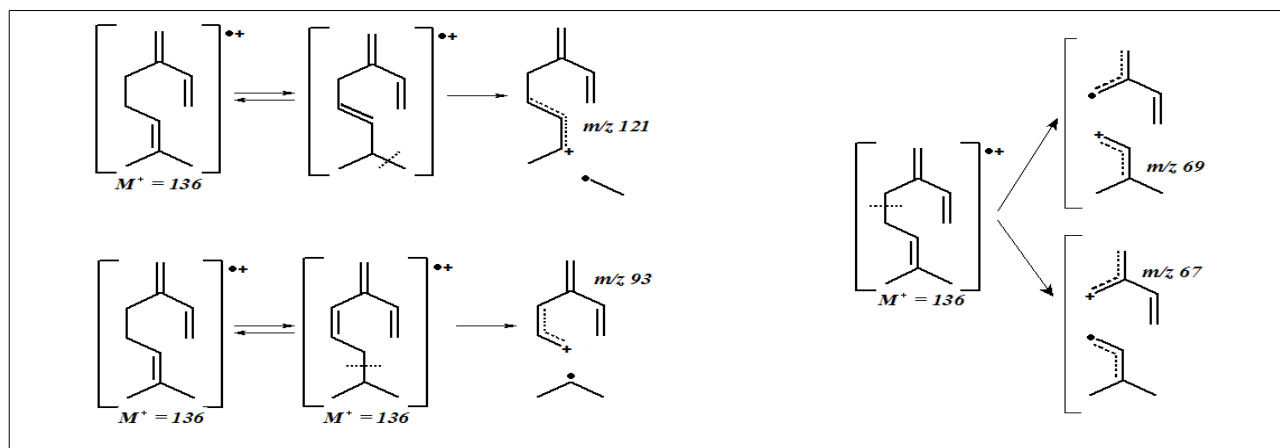


Figura 13: Proposta para a fragmentação do β -mirceno quando analisado em CG-EM.

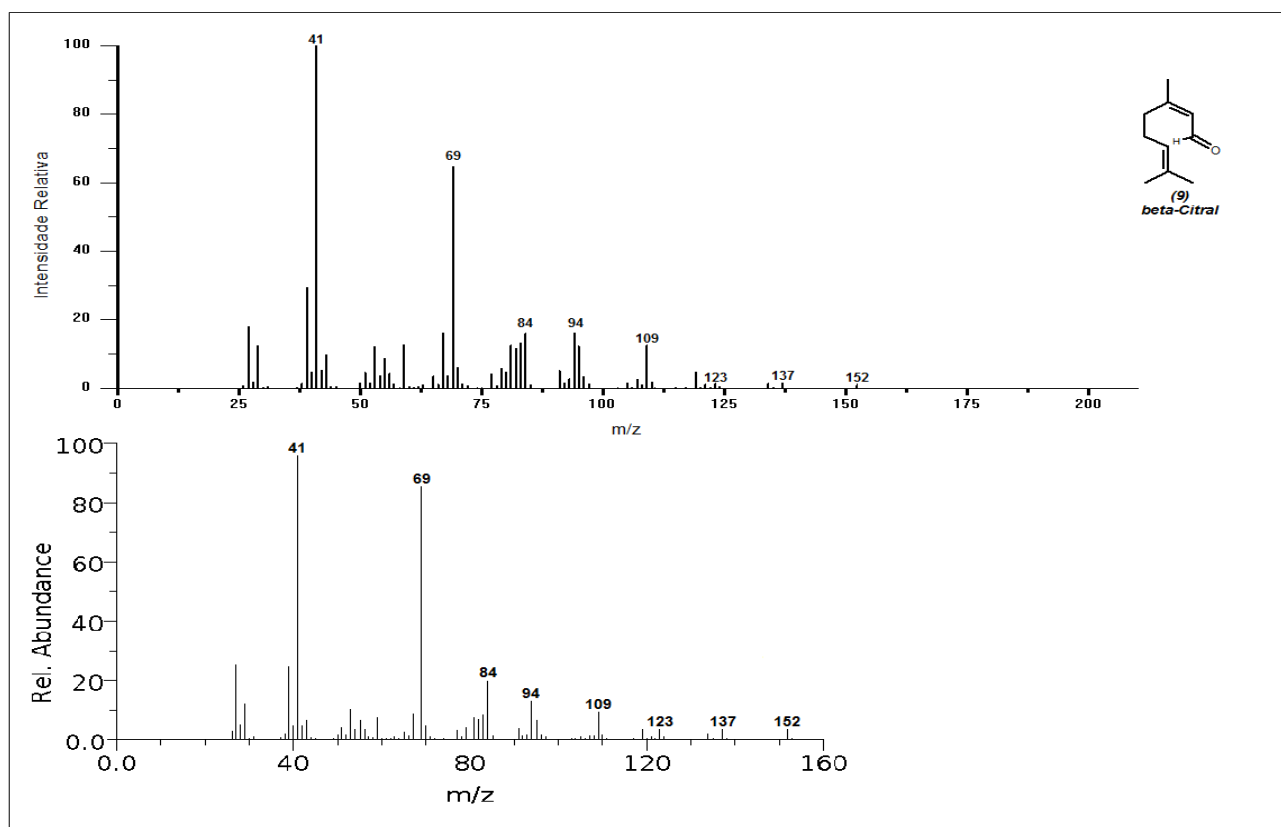


Figura 14. Espectros de massas do β -citral. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).

Na figura 14, pode-se observar os espectros de massas do β -citral, um terpenóide classificado como monoterpreno. O pico do íon molecular pode ser observado em m/z 152. O pico em m/z 137 foi produzido pela perda de um radical metila (Figura 15). Na maioria das vezes é observado em aldeídos alifáticos a α -clivagem do grupo carbonil resultando no fragmento M-29, observado no pico m/z 123. A interpretação do fragmento m/z 109 (M-43) não é tão óbvia, mas poderia ser relativa a perda de um grupo isopropil. O pico em m/z 69 é formado devido a clivagem da ligação na posição alílica. O pico base aparece em m/z 41.

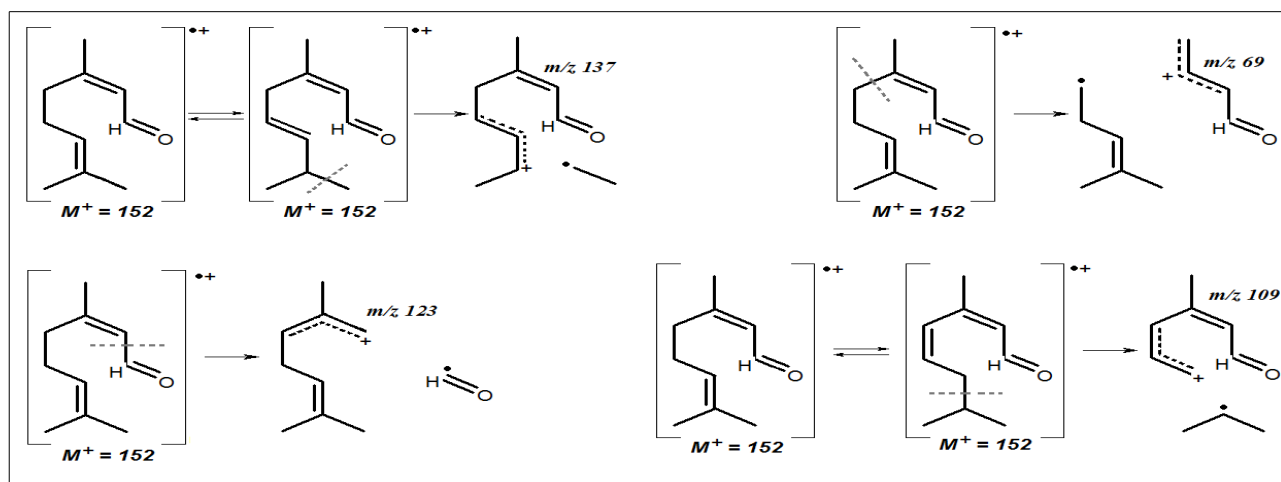


Figura 15: Proposta para a fragmentação do β -citral quando analisado em CG-EM

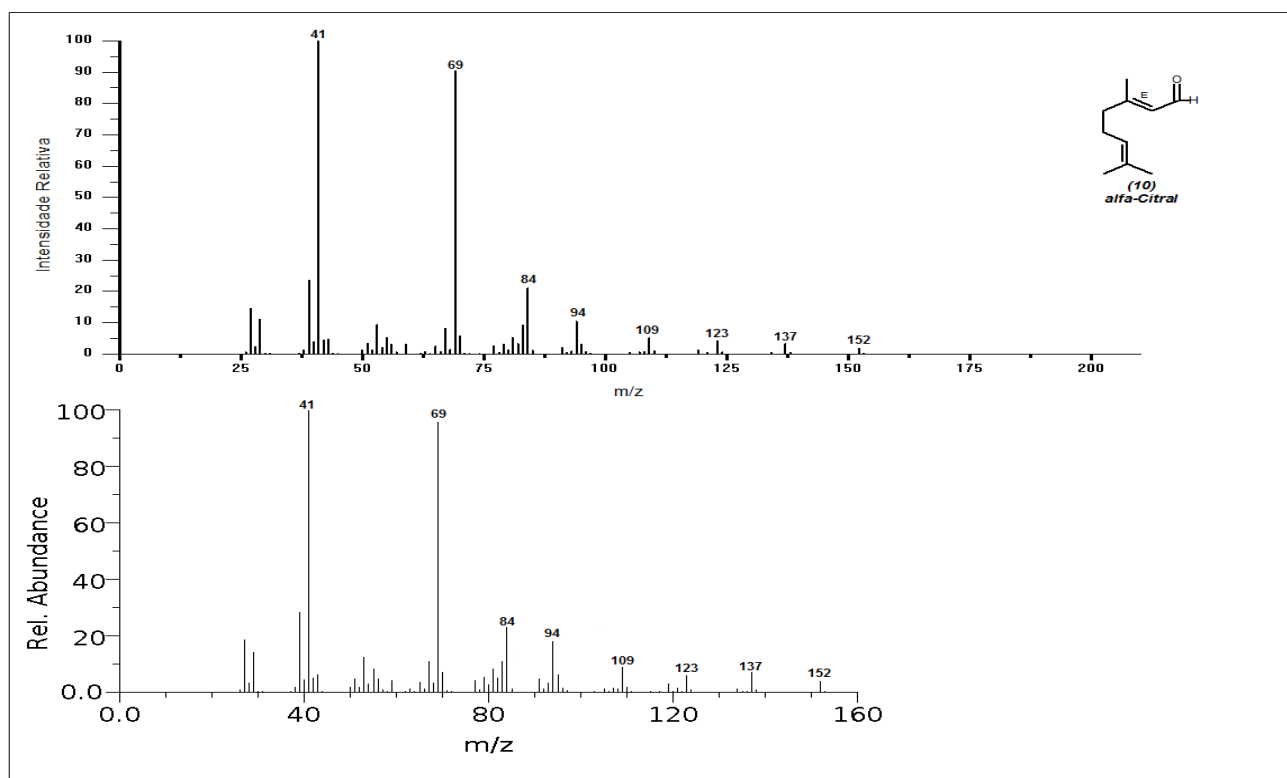


Figura 16. Espectros de massas do α -citral. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).

Na figura 16, pode-se observar os espectros de massas do α -citral, um terpenóide classificado como monoterpene. O α -citral é um isômero do β -citral visto anteriormente, possuindo portanto o mesmo padrão de fragmentação.

A sequência de eluição dos dois isômeros foi deduzida com base no tempo de retenção, levando em consideração a estereoquímica dos dois compostos e suas respectivas interações com a coluna cromatográfica usada na análise. O α -citral apresenta uma estereoquímica mais favorável às interações com a fase estacionária da coluna. O β -citral, por ter a estrutura menos aberta, tem menos facilidade para tais interações e fica portanto menos tempo retido na coluna, sendo o primeiro a eluir. Para ser mais independente das variações do tempo de retenção foi realizada também comparação dos índices de Kovats (IK) teóricos com os calculados. Para o β -citral, $IK_{\text{teórico}} = 1240$, enquanto que para o α -citral o $IK_{\text{teórico}} = 1270$, ou seja, teoricamente o primeiro isômero a eluir é o β -citral. Os índices de Kovats calculados demonstraram a mesma tendência e os valores ficaram bastante próximo dos teóricos. Estes cálculos estão detalhados na sequência e os resultados são demonstrados na tabela 1.

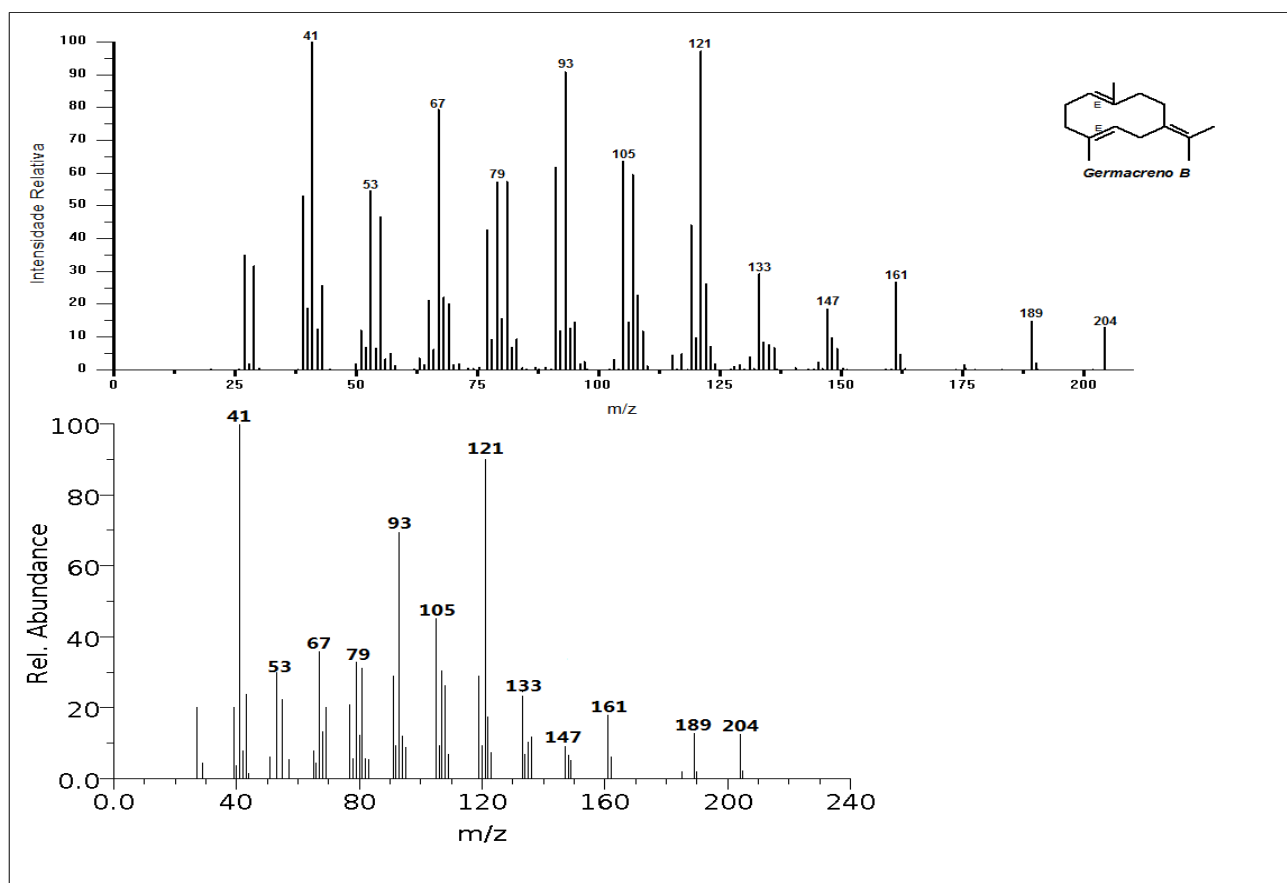
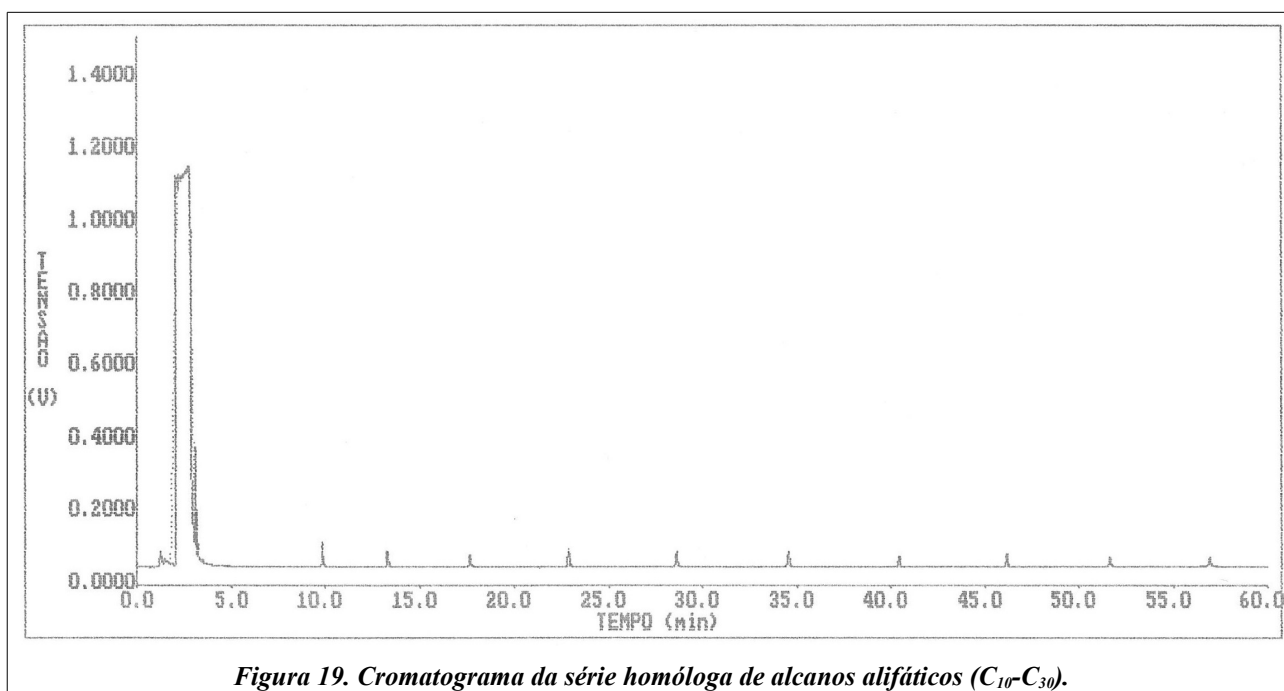
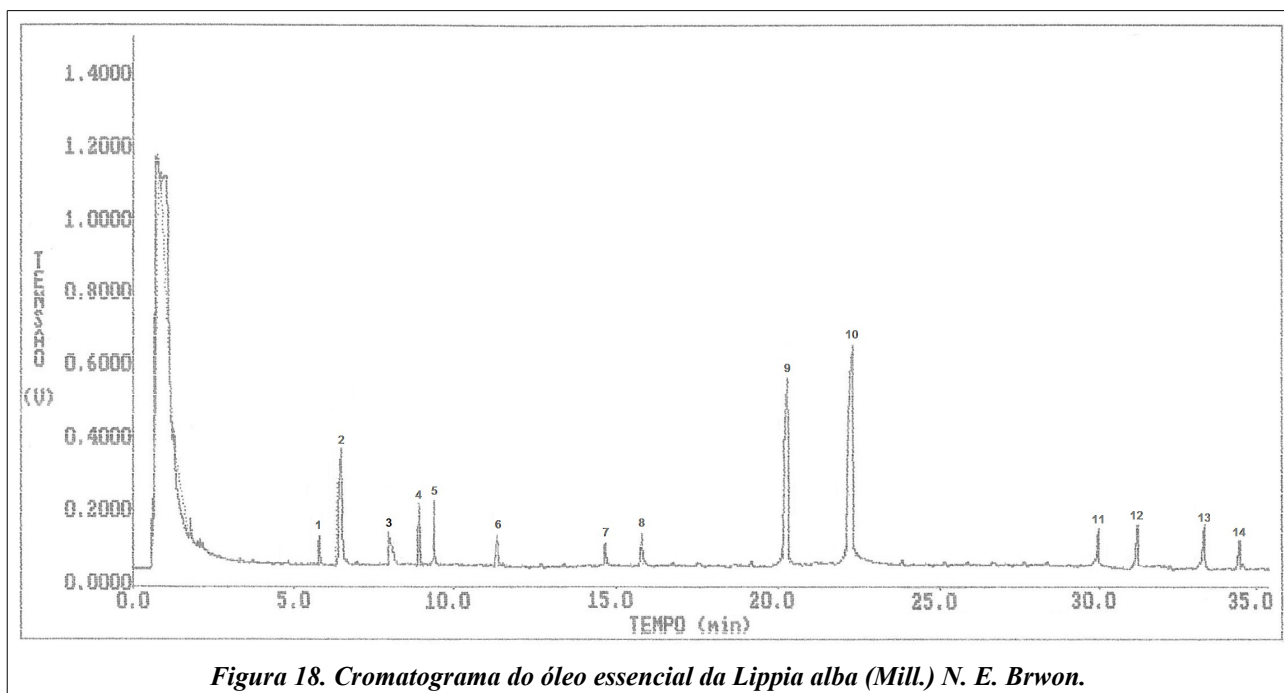


Figura 17. Espectros de massas do germacreno B. Superior: Espectro de massas obtido da amostra. Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).

Na figura 17, pode-se observar os espectros de massas do Germacreno B, um terpenóide classificado como sesquiterpeno. O pico observado em m/z 204 refere-se ao íon molecular. O pico em m/z 189 foi produzido pela perda de um radical metila. A saída de dois fragmentos de etenila, um após o outro pode ter produzido o pico observado em m/z 161 e em m/z 133. O pico base aparece em m/z 41.

Para ter mais segurança na identificação dos picos individuais, foram realizadas novas análises por cromatografia gasosa com as quais foram calculados os índices de retenção de Kovats (IK) dos compostos 1-18 observados na figura 11. Primeiramente foi realizada a análise por CG do óleo essencial da *Lippia alba* (Figura 18) e na sequência foi realizada a análise por CG de uma série homóloga de alcanos alifáticos (C_{10} - C_{30}) (Figura 19).



Para a determinação dos índices de retenção de Kovats, o tempo de retenção de cada um dos picos do cromatograma da amostra (Figura 18) foi relacionado com o tempo de retenção do pico e a quantidade de carbonos do alcano anterior e posterior no cromatograma da série homóloga de alcanos alifáticos (C₁₀-C₃₀) (Figura 19) através da equação apresentada no item 4-3-4 da parte experimental. Exemplos destes cálculos podem ser observados abaixo, utilizando os compostos No. 9 (α -Citral) e No. 10 (β -Citral):

$$I = 100z + 100[(\log t'r_x - \log t'r_z) / (\log t'r_{(z+1)} - \log t'r_z)]$$

Composto x sendo o composto No. 9

$$I = 100(12) + 100[(\log 19,615 - \log 16,590) / (\log 21,823 - \log 16,590)]$$

$$I = 1200 + 100[0,073 / 0,119]$$

$$I = 1261$$

Composto x sendo o composto No. 10

$$I = 100(12) + 100[(\log 21,308 - \log 16,590) / (\log 21,823 - \log 16,590)]$$

$$I = 1200 + 100(0,109 / 0,119)$$

$$I = 1292$$

Onde:

I = índice de retenção de Kovats

z = n° de carbonos do alcano anterior ao composto x

t_M = tempo morto = 1,075

$t'r_x$ = tempo de retenção do composto x menos o tempo morto

$t'r_z$ = tempo de retenção do alcano anterior ao composto x menos o tempo morto

$t'r_{(z+1)}$ = tempo de retenção do alcano que aparece após o composto x menos o tempo morto

A comparação dos valores calculados com os tabelados, mostra que os índices de retenção de Kovats calculados ficam bastante próximo dos teóricos. Vale ressaltar que as relações $IK_{\text{calculado}} \times IK_{\text{teórico}}$ levam em consideração as análises preliminares referente a ordem de eluição dos compostos e os respectivos espectros de massas. Assim, o composto No. 9 que obteve $IK_{\text{calculado}} = 1261$, foi associado ao valor tabelado de $IK_{\text{teórico}} = 1240$ que corresponde ao isômero **β -citral**. Enquanto que o composto No. 10 que obteve $IK_{\text{calculado}} = 1292$, foi associado ao valor tabelado de $IK_{\text{teórico}} = 1270$ que corresponde ao isômero **α -citral**.

Os mesmos estudos foram realizados para os demais compostos presentes na amostra, porém não estão demonstrados. Para os compostos 1, 2, 15-18, não foi possível calcular o IK devido a falta de alguma informação necessária para a correta aplicação da fórmula. Nos compostos 1 e 2 (sabineno e β -mirceno) o tempo de retenção do menor alcano da série C₁₀-C₃₀ foi maior do que o deste composto. Nos compostos 15-18 o tempo usado na programação da análise de CG foi menor do que o necessário para que estes compostos pudessem eluir da coluna de forma que fossem detectados.

A porcentagem de cada componente foi determinada relacionando a intensidade de cada pico com a intensidade total apresentada pelo cromatograma do óleo essencial (Figura 11). Os compostos identificados, cada qual com seu respectivo tempo de retenção, índice de retenção de Kovats (teórico e calculado) e área relativa estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Componentes do óleo essencial da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, tempo de retenção, índice de retenção de Kovats e percentagem em área.

No.	Componente	t _R (min)	IK(teórico)	IK(calculado)	Área (%)
1	Sabineno	12,69	976	*	0,5
2	β -Mirceno	13,40	991	*	5,8
3	p-Cimeno	14,54	1026	1028	0,9
4	β -Ocimeno (<i>trans</i> -ocimeno)	15,44	1050	1051	2,3
5	γ -Terpineno	15,83	1062	1063	2,7
6	Linalool	17,45	1098	1106	1,0
7	<i>trans</i> -Verbenol	20,27	1144	1168	0,6
8	<i>cis</i> -Crisantenol	21,15	1162	1186	1,0
9	β -Citral (<i>neral</i> , <i>cis</i> -citral)	24,03	1240	1261	25,1
10	α -Citral (<i>geranial</i> , <i>trans</i> -citral)	25,60	1270	1292	43,1
11	Geranil acetato	31,98	1383	1395	2,0
12	β -Elemeno	32,50	1391	1422	2,4
13	<i>trans</i> -Cariofileno (β -cariofileno)	34,11	1418	1441	2,8
14	γ -Elemeno	34,95	1433	1455	0,8
15	α -Humuleno (α -cariofileno)	36,07	1454	*	1,0
16	Germacreno-D	37,66	1480	*	1,8
17	Germacreno-A	39,06	1503	*	1,3
18	Germacreno-B	42,00	1556	*	4,9
TOTAL					100,0

*Índice de retenção de Kovats não calculado devido a falta de alguma informação necessária para a correta aplicação da fórmula.

A identificação destes compostos, embora esteja baseada em métodos quantitativos e qualitativos, fornece apenas uma proposta. Existe uma diversidade grande de compostos que possuem índices de retenção de Kovats, bem como fragmentações semelhantes nos seus espectros de massas. No entanto, um conhecimento inicial do que já está publicado sobre a planta e sobre os compostos que podem estar presentes em óleos essenciais, permite propor estruturas para esses compostos tendo em mãos os respectivos índices de retenção de Kovats e seus espectros de massas. As estruturas para os compostos identificados são apresentadas na figura 20.

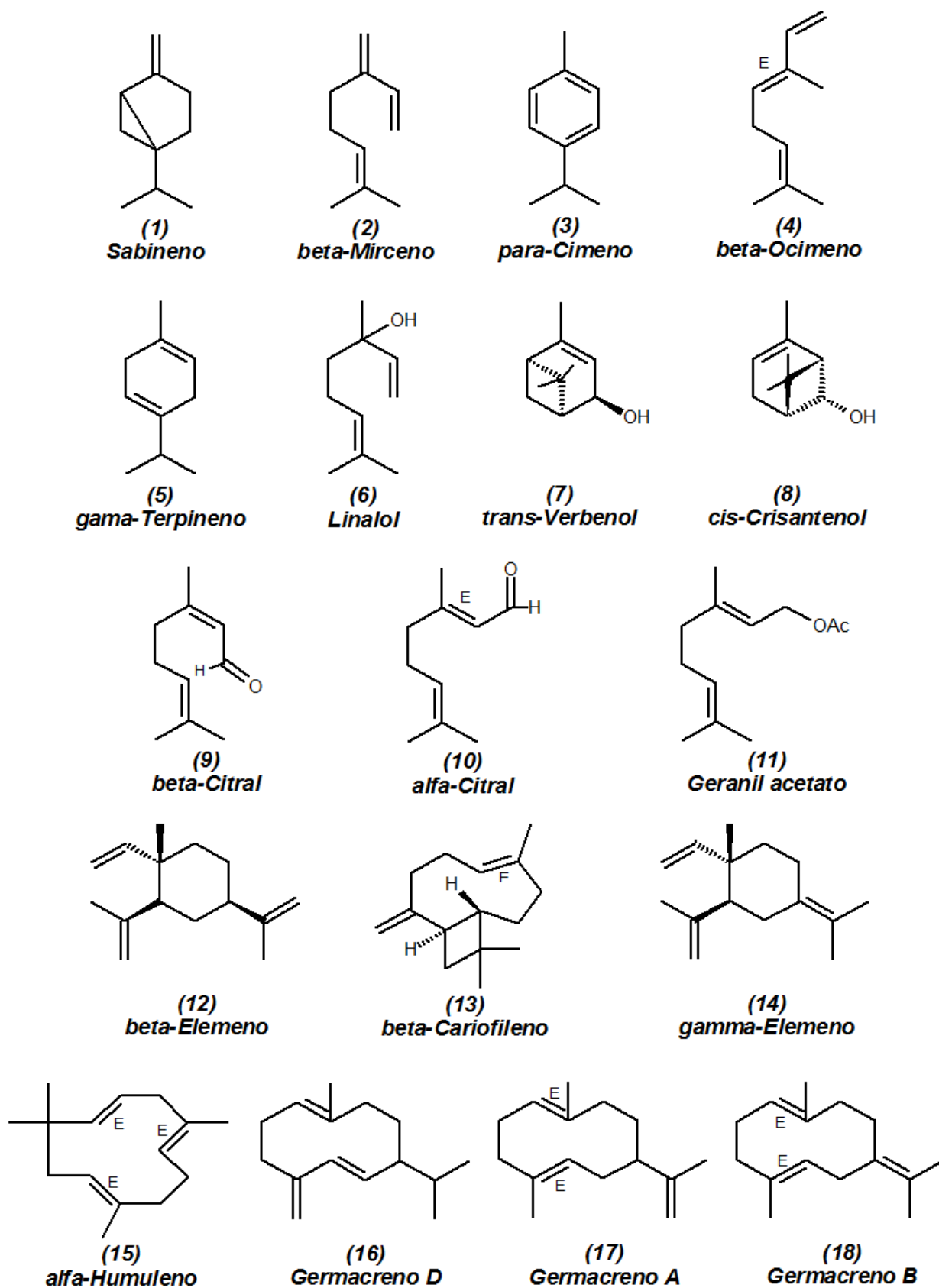


Figura 20. Estruturas propostas para os componentes detectados no óleo essencial extraído da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brwon.

5-3. Investigação da Toxicidade Usando Larvas de *A. salina* (TAS)

O bioensaio utilizando a *Artemia salina* é um procedimento bastante simples, podendo ser desenvolvido em laboratórios clássicos de produtos naturais. Este método tem boa reprodutibilidade e apresenta boa correlação com outros ensaios de toxicidade. Devido a grande sensibilidade da *Artemia salina*, esse bioensaio está estreitamente relacionado com a atividade biológica geral, pois todo composto que possui alguma atividade, também apresenta certa toxidez. Assim, o bioensaio com *A. Salina* torna-se bastante adequado para orientar o isolamento biomonitorado dos princípios ativos de plantas medicinais. Através deste teste, extratos vegetais e óleos essenciais com valores de DL_{50} menor do que 1000 $\mu\text{g/mL}$ são considerados tóxicos frente a *A. Salina*.

A investigação de toxicidade usando larvas de *A. Salina*, demonstrou que o óleo essencial da *Lippia alba* apresenta capacidade de exercer ação tóxica. A dose letal para matar 50 % das larvas (DL_{50}) foi de 499,6 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21). O controle positivo ($\text{Kr}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nas concentrações de 10, 20, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$), apresentou DL_{50} de 25,76 $\mu\text{g/mL}$, garantindo a qualidade das larvas de *A. Salina* (Figura 22).

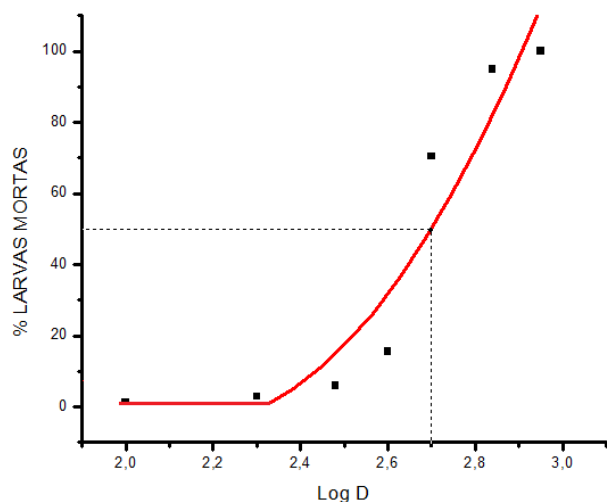


Figura 21. Gráfico da LD_{50} do óleo essencial de *L. alba* na investigação de toxicidade usando larvas de *A. Salina*

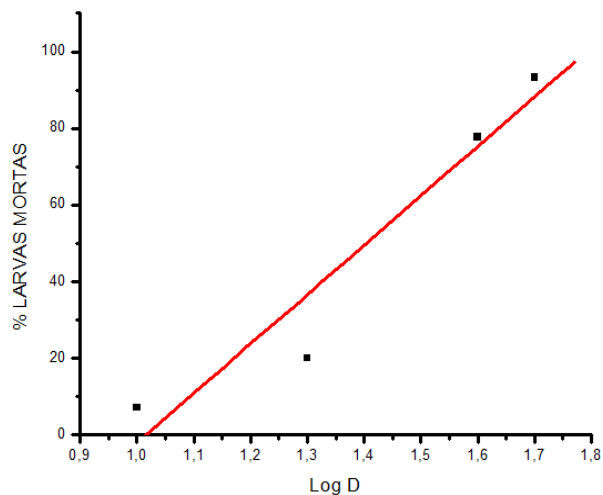


Figura 22. Gráfico da LD_{50} do controle positivo das larvas de *A. Salina*

5-4. Investigação da Atividade Antimicrobiana

As bactérias escolhidas para realizar estes bioensaios foram *Eschrichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes a três grupos microbiológicos diferentes. Assim, a *Eschrichia coli* é um bacilo gram negativo não esporulado, o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria (cocus) gram positiva e a *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo piociânico gram negativo, não esporulado e bastante aeróbio. Os resultados são apresentados na tabela 2, obtidos dos bioensaios realizados para determinação da atividade biológica do óleo essencial da *Lippia alba*.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, frente aos microrganismos *Eschrichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Amostra	Microrganismos		
	<i>E. coli</i> CIM	<i>S. aureus</i> CIM	<i>P. aeruginosa</i> CIM
Óleo essencial <i>L. alba</i>	2,26 mg/mL	0,56 mg/mL	4,53 mg/mL
Gentamicina	0,39 µg/mL	0,21 µg/mL	0,39 µg/mL

Com base nestes bioensaios, observa-se que o óleo essencial da amostra apresenta capacidade de exercer ação antibacteriana moderada a fraca frente aos microrganismos testados. Os resultados apresentados mostram atividade antibacteriana **moderada** frente a bactéria *S. aureus* (CIM 0,56 mg/mL), e atividade antibacteriana **fraca** frente as bactérias *P. aeruginosa* (CIM 4,53 mg/mL) e *E.coli* (CIM 2,26 mg/mL). Torna-se difícil atribuir a atividade antimicrobiana à algum constituinte específico do óleo essencial desta espécie, para tal seria necessário isolar cada componente. No entanto, estão presentes na amostra, compostos com ação bactericida já descrita na literatura, como por exemplo os álcoois linalol (6), trans-verbenol (7) e cis-crisantenol (8) (Pelczar et al., 1988) e compostos com ação bacteriostática, também descrita na literatura, como o β -mirceno (2), p-cimeno (3), β -ocimeno (4), β -cariofileno (13) e α -Humuleno (15) (Dorman & Deans, 2000; Magiats et al., 2002; Oumzil et al., 2002; Burt, 2004; Valero & Frances, 2006). Além desses exemplos, Kurita et al (1981), descreve que alguns aldeídos, entre eles o β -citral (9) e o α -citral (10) apresentam significativa atividade antimicrobiana especialmente por terem uma ligação dupla conjugada com a carbonila, resultando em espécie com alta densidade eletrônica, o que explicaria sua ação; compostos desse tipo podem interferir no processo biológico envolvendo transferência de elétrons, além de interagir com o nitrogênio presente em proteínas e ácidos nucleicos, inibindo desta forma, o crescimento de microrganismos.

5-5. Investigação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical Livre DPPH (2,2-Difenil-picril-hidrazil)

A investigação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (Figura 23) é um método que determina a capacidade sequestrante de radicais livres de uma amostra, envolvendo a medida espectrofotométrica do cromóforo 2,2-Difenil-picril-hidrazil (DPPH).

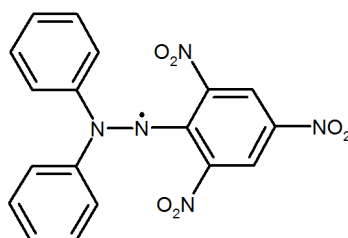


Figura 23. Cromóforo DPPH

Este método é muito usado para medir a capacidade antioxidante em um tempo relativamente curto comparado com outras técnicas. Baseia-se na inibição do acúmulo de produtos oxidados, tão logo sejam formados. O efeito da ação antioxidante do radical DPPH é devido a sua habilidade de captar hidrogênio. Extratos vegetais e óleos essenciais apresentam atividade antioxidante significativa quando IC_{50} é menor do que 200 ppm.

A investigação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH, demonstrou que o óleo essencial da *Lippia alba* não apresenta capacidade de exercer ação antioxidante nas concentrações testadas, porém foi feita uma projeção da reta de decréscimo da absorbância de DPPH para estimar o valor de IC_{50} . Os resultados são apresentados na figura 24.

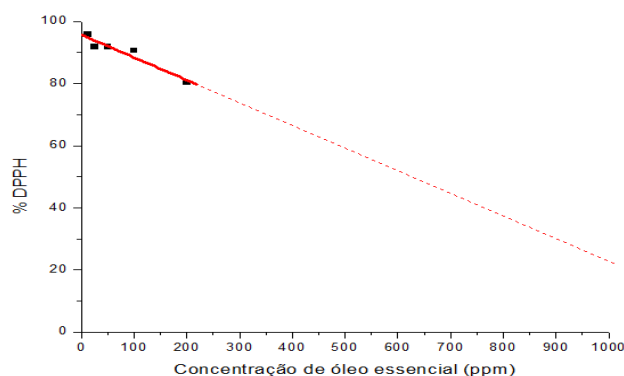


Figura 24. Gráfico para determinação de IC_{50} do óleo essencial da *L. alba* na investigação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH.

A concentração (óleo essencial) projetada, necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50 % (IC_{50}) foi de 624 ppm.

6. CONCLUSÕES

Claramente, há um interesse florescente em óleos essenciais para abordar uma variedade de benefícios acerca do bem estar humano. Este trabalho oferece uma idéia de como os óleos essenciais podem ser utilizados e sua importância econômica para indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos. Através de uma breve revisão bibliográfica descreve o que são os óleos essenciais do ponto de vista químico, sua composição, biossíntese, métodos de extração e armazenamento, métodos de caracterização dos componentes químicos, assim como também faz uma descrição da espécie vegetal que foi objeto desta pesquisa, a *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown proveniente de Santo Amaro da Imperatriz (SC). Os métodos experimentais foram relatados de forma resumida porém tomando o cuidado de fornecer todos os detalhes importantes para que sejam de fácil reprodução. Os objetivos aos quais este trabalho se propôs foram atingidos, ficando constatado que:

- i. Foi extraído 1% do óleo essencial da *Lippia alba* através da técnica de destilação por arraste a vapor;
- ii. O índice de refração medido para o óleo essencial desta espécie foi de 1,473 e a rotação óptica medida foi de $-0,12^\circ$;
- iii. Os estudos permitiram identificar que o óleo essencial da *Lippia alba* é composto em sua grande maioria por terpenos, dos quais 55,6% são monoterpenos, 38,9% são sesquiterpenos e apenas 5,6% são terpenos oxigenados. Destacam-se como principais constituintes: α -citral (43,1%), β -citral (25,1%), β -mirceno (5,8%) e germacreno-B (4,9%), que somados representam uma área total de 78,9%. Com base nesta composição ficou constatando que se trata de uma espécie com o quimiotipo **citral – mirceno**;
- iv. O óleo essencial apresentou atividade tóxica frente a *Artemia Salina* e atividade antimicrobiana frente aos três microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Porém, este óleo essencial não apresentou atividade antioxidante em relação ao radical livre DPPH.

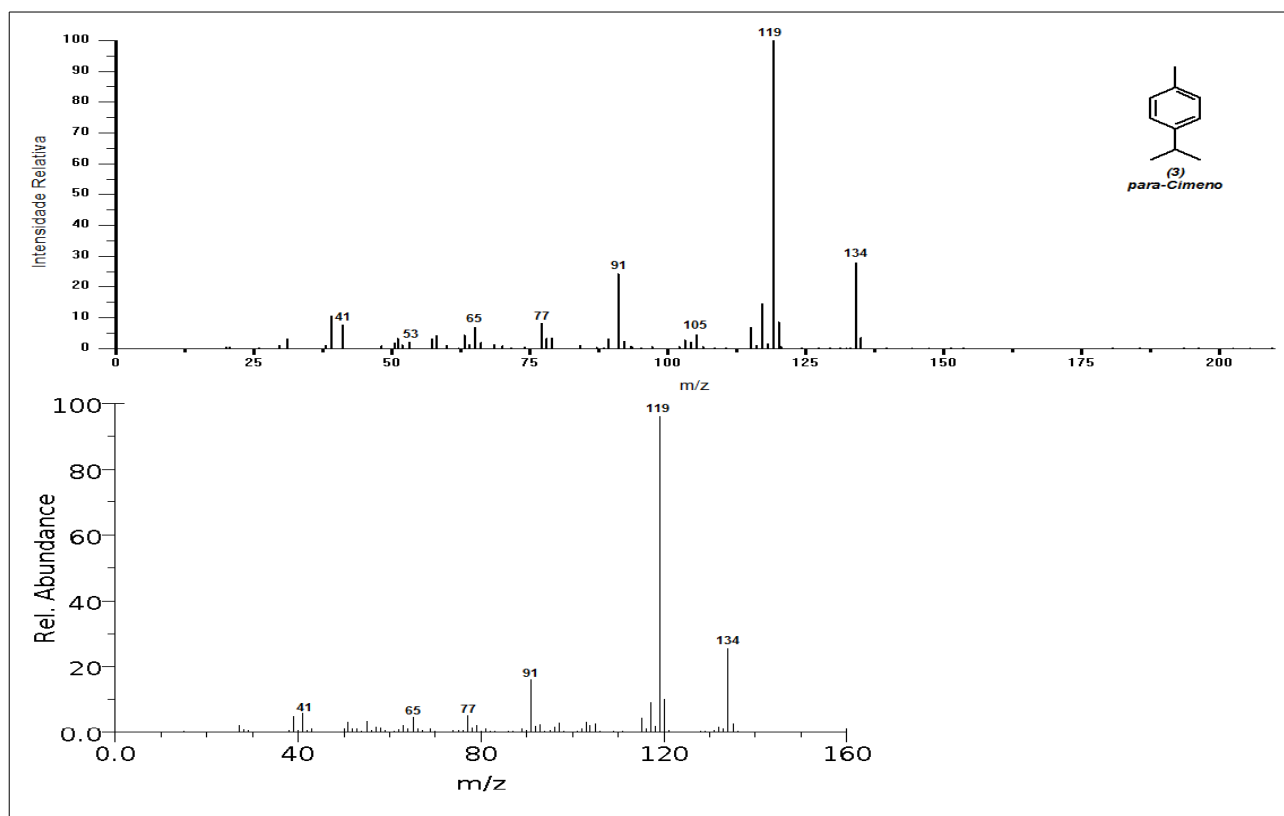
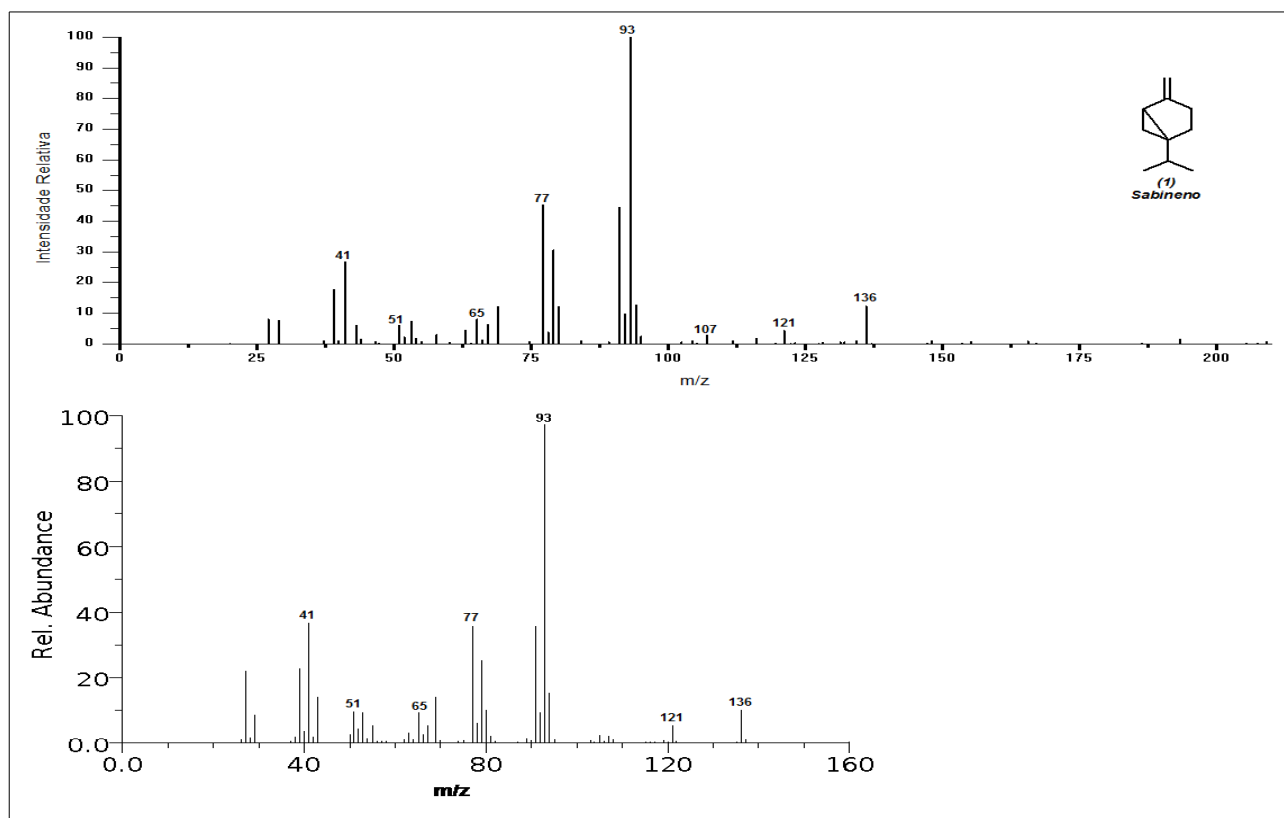
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

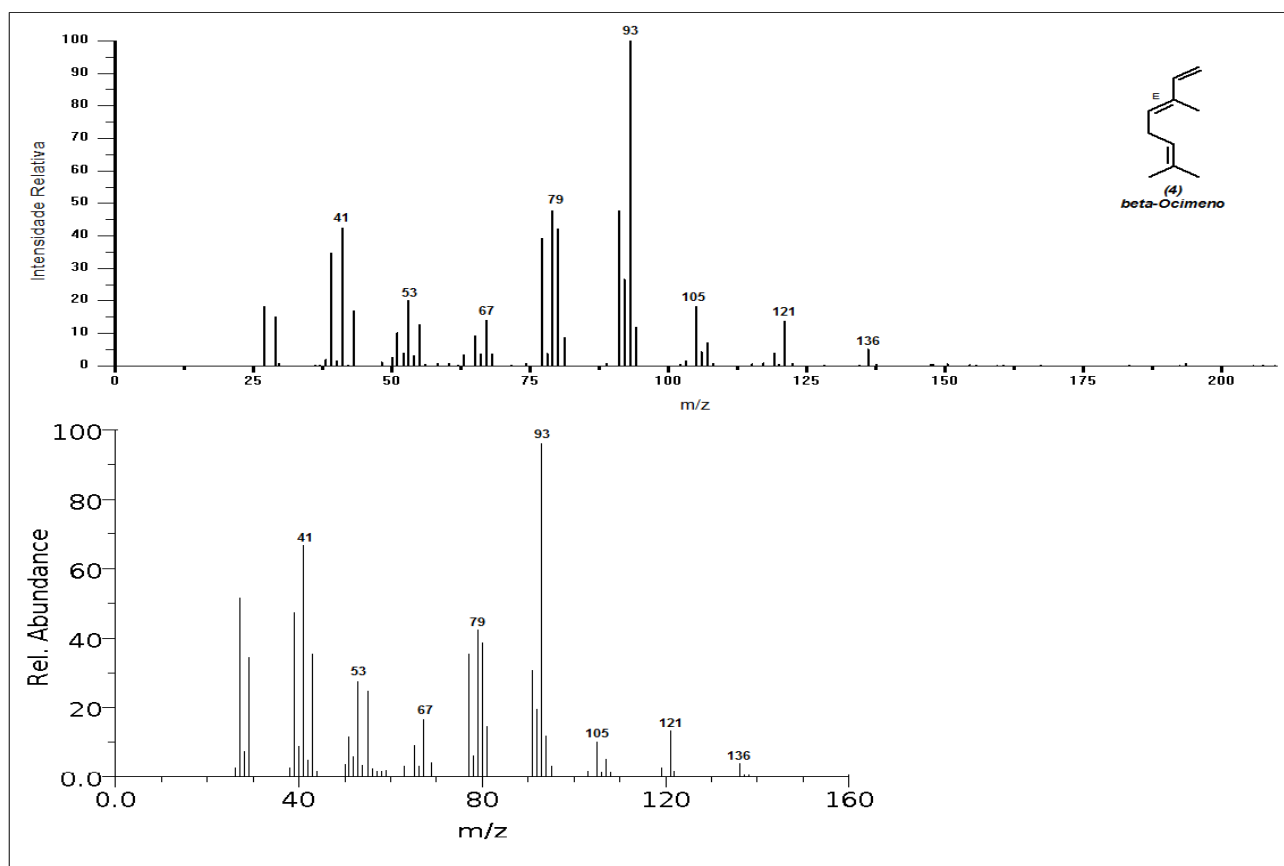
- Adams, R.P.; **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, 1995, Illinois, USA.
- Bell, E.A.; Charlwood, B.V.; **Secondary Plant Products**, Springer-Verlag, 1980, New York, USA.
- Bernardo-Gil, M.; Gabriela M.; Albertina R.; Esquível M.M.; **Produção de Extratos para a Indústria Alimentar: Uso de Fluidos Supercríticos**, DEQ IST, Lisboa, Portugal.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Resolução 104/99, de 26/04/1999, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1999, 14/05/99.
- Brenna, E.; Funganti, C.; Serra, S.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 2003, 14, 1.
- Burt, S.; **Int J Food Microbiol**, 2004, 94, 223.
- Cavin, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O.; **Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa***, *Planta Medica*, 1998, 64, 393-396.
- Chalcat, J.C.; Chiron, F.; Garry, R.; Lacoste, J.; Sautou, V.; **Photochemical Hydroperoxidation of Terpenes, Antimicrobial Activity of α -Pinene, β -Pinene and Limonene Hydroperoxides**, *Journal of Essential Oil Research*, 12, 1, 125-134.
- Craveiro, A.A.; Machado, M.I.L.; **De Aromas Insetos e Plantas**, *Ciência Hoje*, 1968, 4, 23, 54-63.
- Croteau, R.; **The discovery of terpenes**, *Discoveries in Plant Biology*, 1998, 1, 329-343.
- Croteau, R.; Winters, J.N.; **Demonstration of the Intercellular Compartmentation of l-Menthone Metabolism in Peppermint (*Mentha piperita*) Leaves**, *Plant Physiology*, 1982, 69, 975-977.
- Crowell, P.L.; Gould, M.N.; **Cancer Chemopreventive Activity of Monoterpenes and Others Isoprenoids**, *Cancer Chemoprevention* 2004, 1, 371-378.
- Cseke, Leland J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.L.; Duke, J.A.; Briemann, H.L.; **Natural Products From Plants**, Taylor & Francis Group, 2ª Edição, 2006, Boca Raton, FL, USA.
- Dewick, Paul M.; **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, John Wiley & Sons Ltda, 1997, England.
- Dodt, Colleen K.; **The Essential Oils Book**, VT: Storey Publishing, 1996, Pownal.
- Dorman, H.J.D.; Deans, S.G.; **Journal of Applied Microbiology**, 2000, 88, 308.
- Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Sartoratto, A.; Rehder, V.L.G.; Delarmelina, C.; **Anti-Candida Activity of Brazilian Medicinal Plants**, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 97, 305-311.
- Dudareva, N.; Cseke, L.; Blanc, V.M.; Pichersky, E.; **Evolution of Floral Scent in *Clarkia*: Novel Patterns of S-Linalool Synthase Gene Expression in the *C. Breweri* Flower**, *The plant Cell*, 1996, 8,7, 1137-1148.
- Duke, J.A.; **Handbook of Medicinal Herbs**, CRC. Press, 1985, Boca Raton, FL, USA.
- Gil, A.; De La Fuente, E.B.; Lenardis, A.E.; Pereira, M.L.; Suarez, S.A.; Bandoni, A.; Van Baren, C.; Di Leo Lira, P.; Ghersa, C.M.; **Coriander Essential Oil Composition from Two Genotypes Grown in Different Environment Conditions**, *Journal of Agric Food Chem*, 2002, 50, 2870-2877.
- Godefroot, M.; Sandra P.; Verzele M.; **New Method for Quantitative Essential Oil Analysis**, *Journal of Chromatography*, 1981, 203, 325-335.
- Guenther, E.; **The Essential Oils**, D. van Nostrand Company, 1948, New York, USA.
- Gurgel do Vale, T.; Furtado, E.C; Santos Jr., J.G.; Viana, G.S.B.; **Central Effects of Citral, Myrcene and Limonene, Constituents of Essential Oil Chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown**, *Phytomedicine*, 2002, 9, 709-714.
- Harborne, J.B.; **Ecological Biochemistry**, Academic, 4ª ed., 1993, London, England.
- Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Joseph, H.; Bailleul, F.; **Ethnopharmacology of *Lippia alba***, 2008, 116, 211-222.
- Hoet, S.; Opperdoes, F.; Brun, R.; Quetin-Leclercq, J.; **Natural Products Active Against African Trypanosomes: A Step Towards New Drugs**, *Nat Prod Rep*, 2004, 21, 353-364.
- Joly, A.B.; **Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal**, Companhia Editora Nacional, 11ª Edição, 1993, São Paulo.

- Kanakis, C.D.; Daferera, D.J.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G.; ***Qualitative Determination of Volatile Compounds and Quantitative Evaluation of Safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron***, J Agric Food Chem, 2004, 52, 4515-4521.
- Kitson, F.G.; Larsen, B.S.; McEwen, C.N.; ***Gas Chromatography and Mass Spectrometry – A Practical Guide***, Academic Press (Harcourt Brace & Company), 1996, San Diego, California, USA.
- Knobloch, K.; Weigand, H.; Weis, N.; Schwarm, M.; Vigenschow, H.; ***Action of Terpenoids on Energy Metabolism***, In: Brunke, E.J. (ed.), Progress in Essential Oil Research, Guyer, 1986, Berlin, Germany.
- Kovar, K.A.; Gropper, B.; Friess, D.; Ammon, H.P.; ***Blood Levels of 1,8-Cineole and Locomotor Activity of Mice After Inhalation and Oral Administration of Rosemary Oil***, Plant Med, 1987, 53, 315-318.
- Kurita, N.; Miyaji, M.; Kurane, R.; Takahara, Y.; Ichimura, K.; ***Agric Biol Chem***, 1981, 45, 945.
- Librowski, T.; Vetulani, J.; Nalepa, I.; ***Carane derivative Stereoisomers of Different Local Anaesthetic and Antiplatelet Activity Similarly Potentiate Forskolin-Stimulated Cyclic AMP Response and Bind to beta-Adrenoceptors in the Rat Brain Cortex***, J Pharm Pharmacol, 2004, 56, 1429-1434.
- Lobato, A.M.; Ribeiro, A.; Pinheiro, M.F.S.; Maia, J.G.S.; ***Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais da Amazônia***, Acta Amazônica, 1989, 19, 355-363.
- Lorenzi H.; Matos, F.J.A.; ***Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas***, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002, Nova Odessa, SP, Brasil.
- Magiats, P.; Skaltsounis, A.L.; Chinou, I.; Haroutounian, A.S.; ***Chemical Composition and in-vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Three Greek Achillea Species***, Z Naturforsch 2002, 57c, 287.
- Meyer, B.N.; ***Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active-Plant Constituents***, Planta Médica, 1982, 45,1, 31-34.
- Mazza, G.; ***Gas Chromatographic and Mass Spectrometric Studies of the Constituents of the Rhizome of Calamus I. The Volatile Constituents of the Essential Oil***, J Chromatography, 1985, A, 328, 179-194.
- McGeady, P.; Wansley, D.L.; Logan, D.A.; ***Carvone and Perillaldehyde Interfere with the Serum-induced Formation of Filamentous Structures in Candida albicans at Substantially Lower Concentrations than those Causing Significant Inhibition of Growth***, J Nat Prod, 2002, 65, 953-955.
- McHoy, P.; Westland, P.; ***The Herb Bible***, Barnes & Noble Inc., 1994, New York, USA.
- Moteki, H.; Hibasami, H.; Yamada, Y.; Katsuzaki, H.; Imai, K.; Komiya, T.; ***Specific Induction of Apoptosis by 1,8-Cineole in two Human Leukemia Cell Lines, But Not in a Human Stomach Cancer Cell Line***, Oncol Rep 2002, 9, 757-760.
- Mothes, K.; ***Historical Introduction of Plant Products***, Springer, 1980, Berlin, Germany.
- Oliveira, D.R.; Leitão, G.G.; Santos, S.S.; Bizzo, H.R.; Lopes, D.; Alvino, C.S.; Alvino, D.S.; Leitão, S.G.; ***Ethnopharmacological Study of Two Lippia Species from Oriximiná – Brazil***, Journal of Ethnopharmacology, 2006, 108, 103-108.
- Opdyke, D.; ***Monographs on Fragrance Raw Materials, Myrcene***, Food and Cosmet Toxicol, 1987, 14, 687-689.
- Oumzil, H.; Ghouami, S.; Rhajaoui, M.; Hidrissi, A.; Fkih-Tetouani, S.; Faïd, M.; Benjouad, ***Phytother Res***, 2002, 16, 727.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D.S.; Villar, A.; ***Journal of Ethnopharmacology***, 2001, 76, 201-214.
- Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R.; ***Control of Microorganisms, the Control of Microorganisms by Physical Agents***, Microbiology, 469, McGraw-Hill International, 1998, New York.
- Ramos, A.; Visozo, A.; Piloto, J.; García, A.; Rodríguez, C.A.; Rivero, R.; ***Journal of Ethnopharmacology***, 2003, 87, 241-246.
- Sacchetti, J.C.; Poulter, C.D.; ***Creating Isoprenoid Diversity***, Science, 1997, 277, 1788-1789.
- Schmidt, T.J.; Brun, R.; Willuhn, G.; Khalid, S.A.; ***Anti-Trypanosomal Activity of Helenalin and Some Structurally Related Sesquiterpenes Lactones***, Planta Medica, 2002, 68, 750-751.
- Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P.; Dugo, G.; ***Characterisation of Lavender Essential Oils by Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Correlation of Linear Retention Indices and Comparison with Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography***, J Chromatography, 2002, A, 970, 225-234.

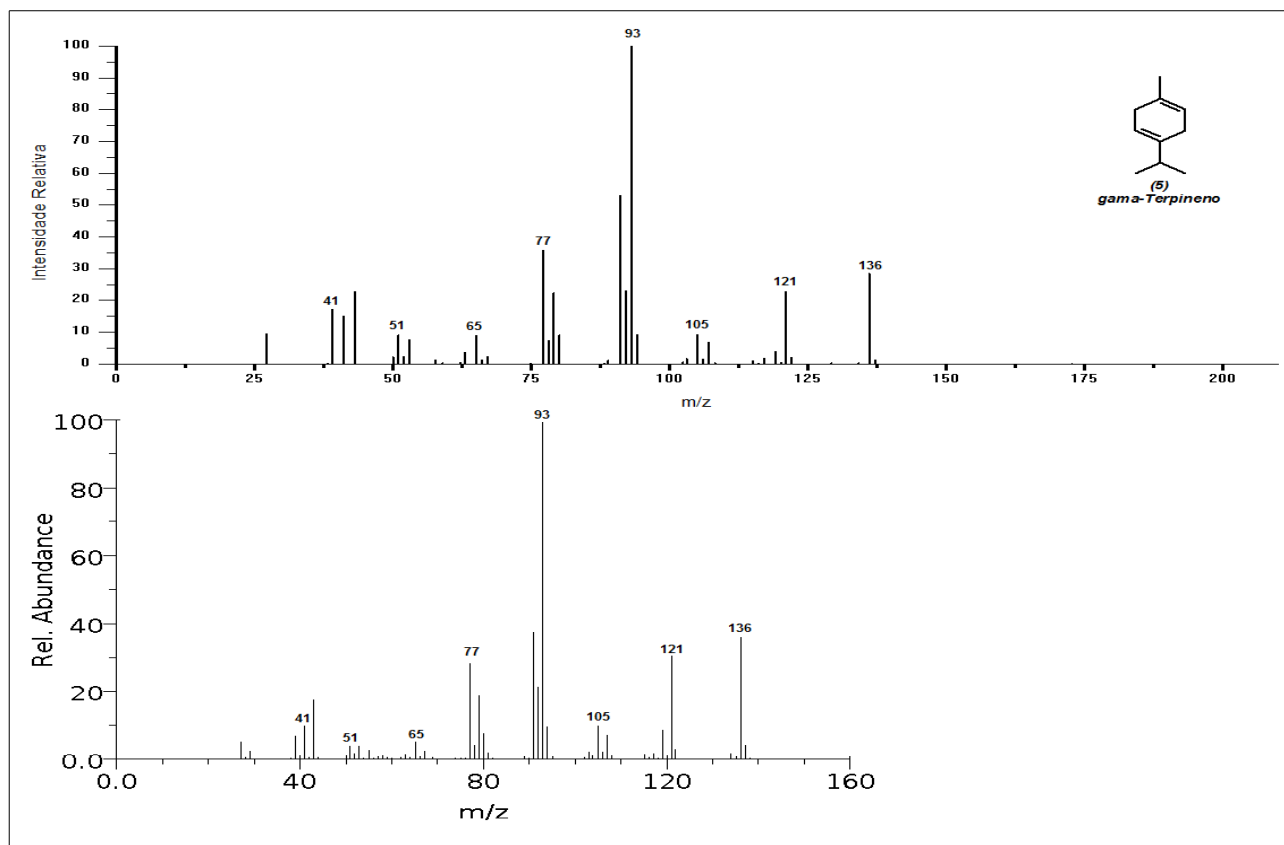
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; De Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.; [et al], ***Farmacognosia, da Planta ao Medicamento***, 6ª Edição, 2007, Editora da UFRGS, Porto Alegre, Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil.
- Sirisoma, N. S.; Hold, K.M.; Casida, J.E.; ***The α - and β -Thujones (Herbal Medicines and Food Additives): Synthesis and Analysis of Hydroxyl and Dehydro Metabolites***, J Agric Food Chem, 2001, 49, 1915-1921.
- Souza, S.M.; Delle-Monache, F.; Smânia Jr. A.; ***Antibacterial Activity of Coumarins***, Z. Naturforsch, 2005, 60, 693-700.
- Stashenko E.E.; Jaramillo, B.E.; Martínez, J.R.; ***Journal of Chromatography***, 2004, A, 1025, 93-103.
- Taiz, Lincoln; Zeiger, E.; ***Plant Physiology***, Sinauer Associates Inc. Publisher, 3rd ed, 2002, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Temple, W.; Smith, N.; Beasley, M.; ***Management of Oil of Citronella Poisoning***, J Toxicol Clin Toxicol, 1991, 29, 257-262.
- Tepe, B.; Sokmen, M.; Sokmen, A.; Daferera, D.; Polissiou, M.; ***Jorn Food Engineer***, 2005, 69, 335.
- Trudgill, P. W.; ***Microbial Metabolism and Transformation of Selected Monoterpenes - Biochemistry of Microbial Degradation***, C. Ratledge (Ed.), 1994, Kluwer, Dordrecht, 33-61.
- Valero, M.; Frances, E.; ***Food Microbiology***, 2006, 23, 68.
- Vieira, L.S.; Albuquerque, J.M.; ***Fitoterapia Tropical – Manual de Plantas Medicinais***, FCAP – Serviço de Documentação e Informação, Belém.
- Waterman, P.G.; Mole, S.; ***Analysis of Phenolic Plant Metabolites***, Blackwell Scientific Publications, 1994, Oxford, England.
- Yuba, A.; Honda, G.; Koezuka, Y.; Tabata, M.; ***Genetic Analysis of Essential Oils Variants in Perilla frutescens***, Biochem Genet, 1995, 33, 341-348. See also: Gernot Katzers Spice Dictionary. Perilla. http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzner/eng/genetic_frame.html?Peri_fru.html.

APÊNDICE

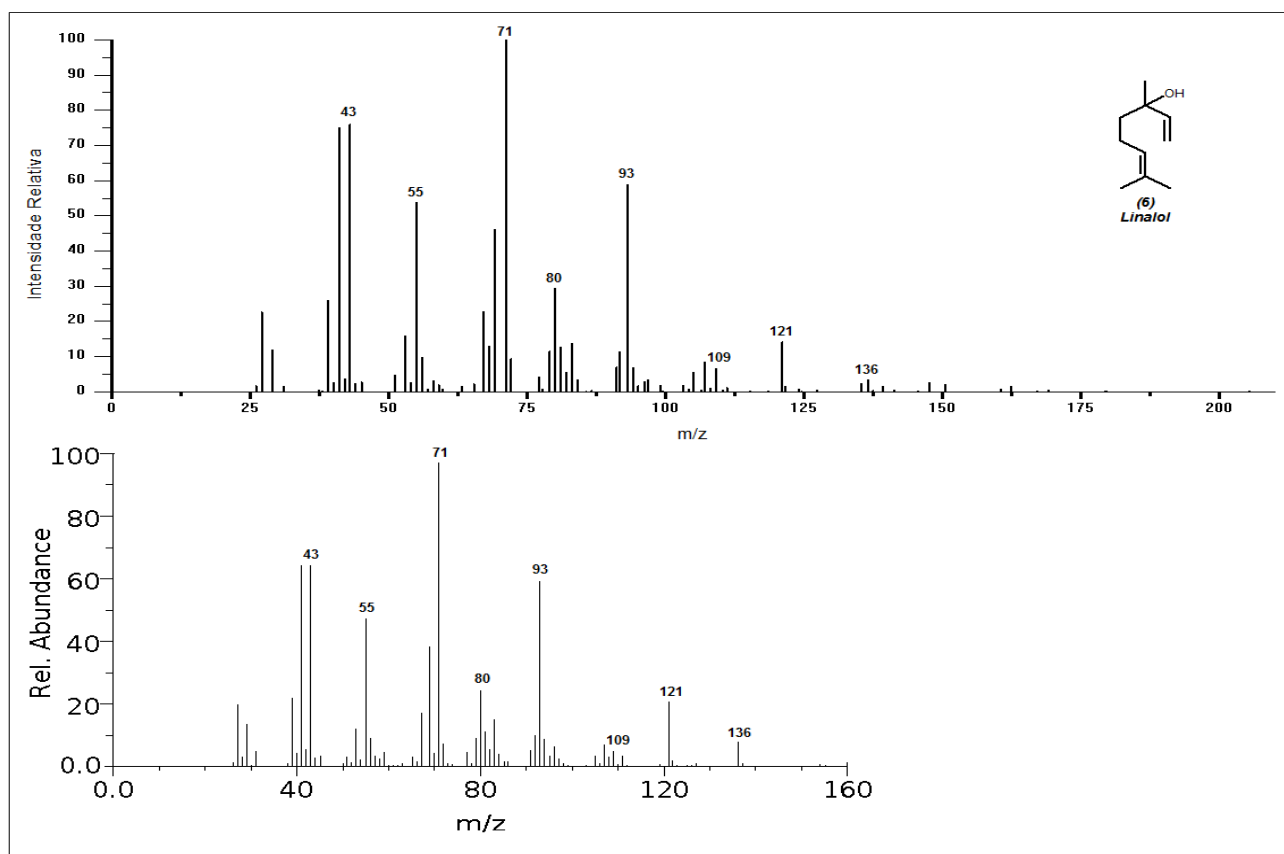




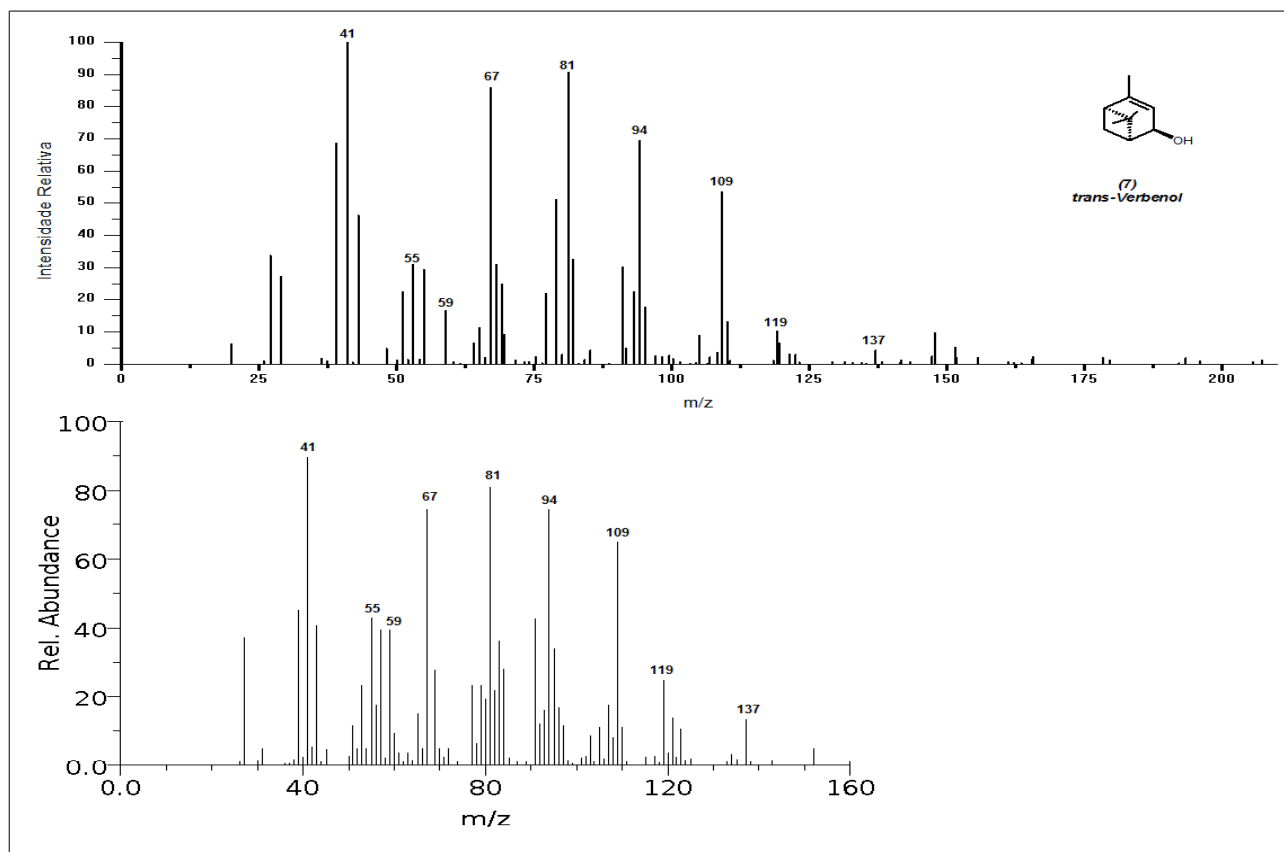
*Espectros de massas do β -Ocimeno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



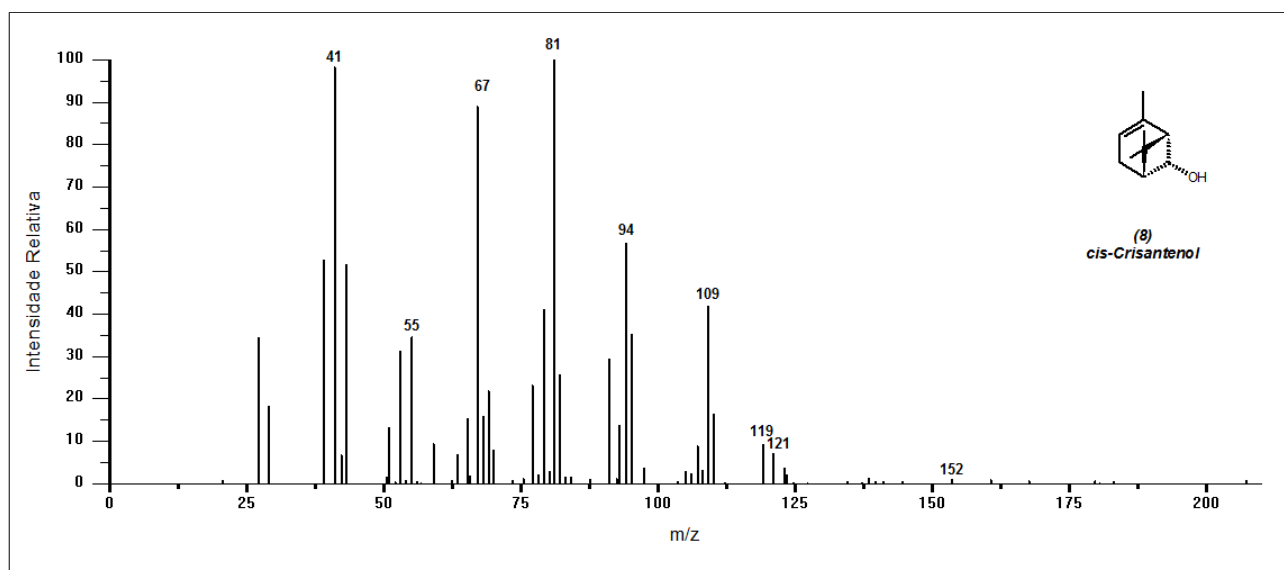
*Espectros de massas do γ -Terpineno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



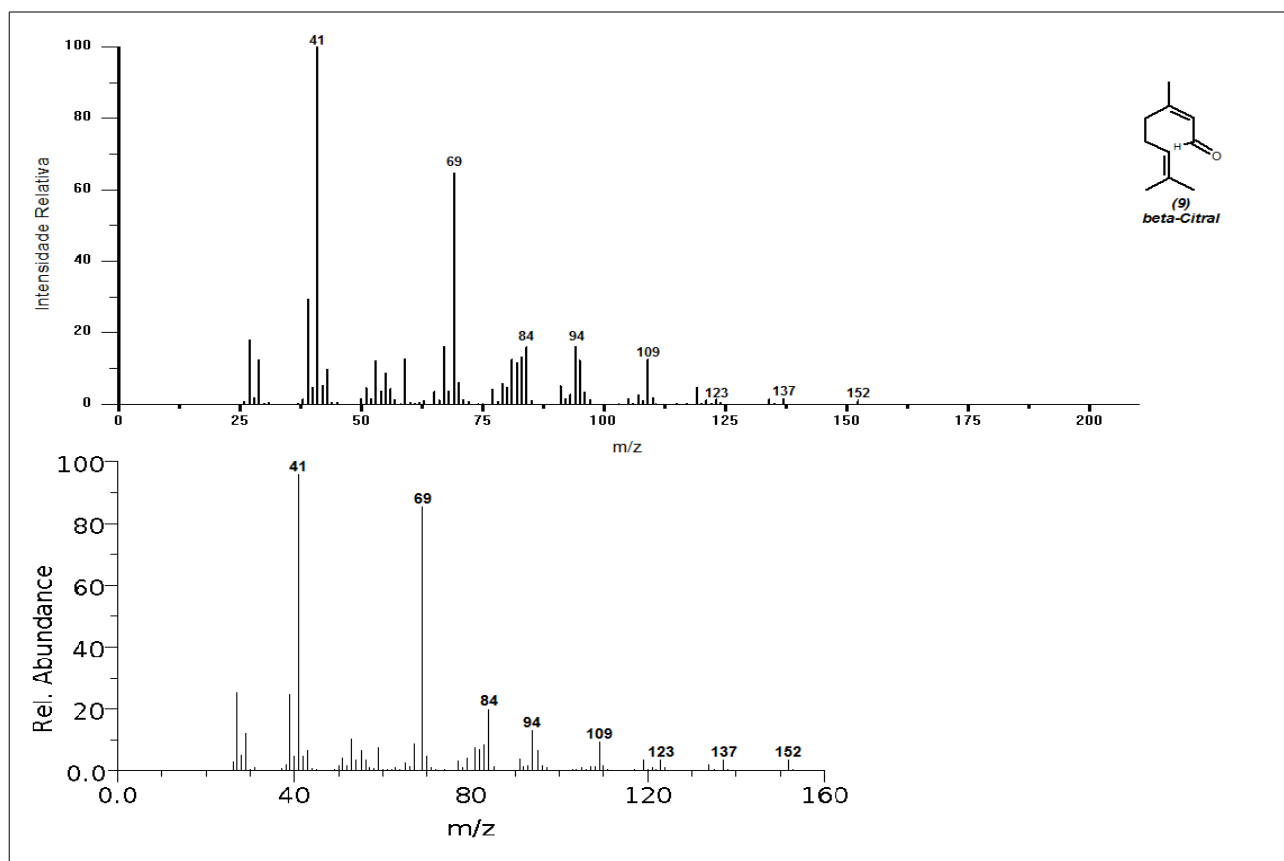
*Espectros de massas do Linalol. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



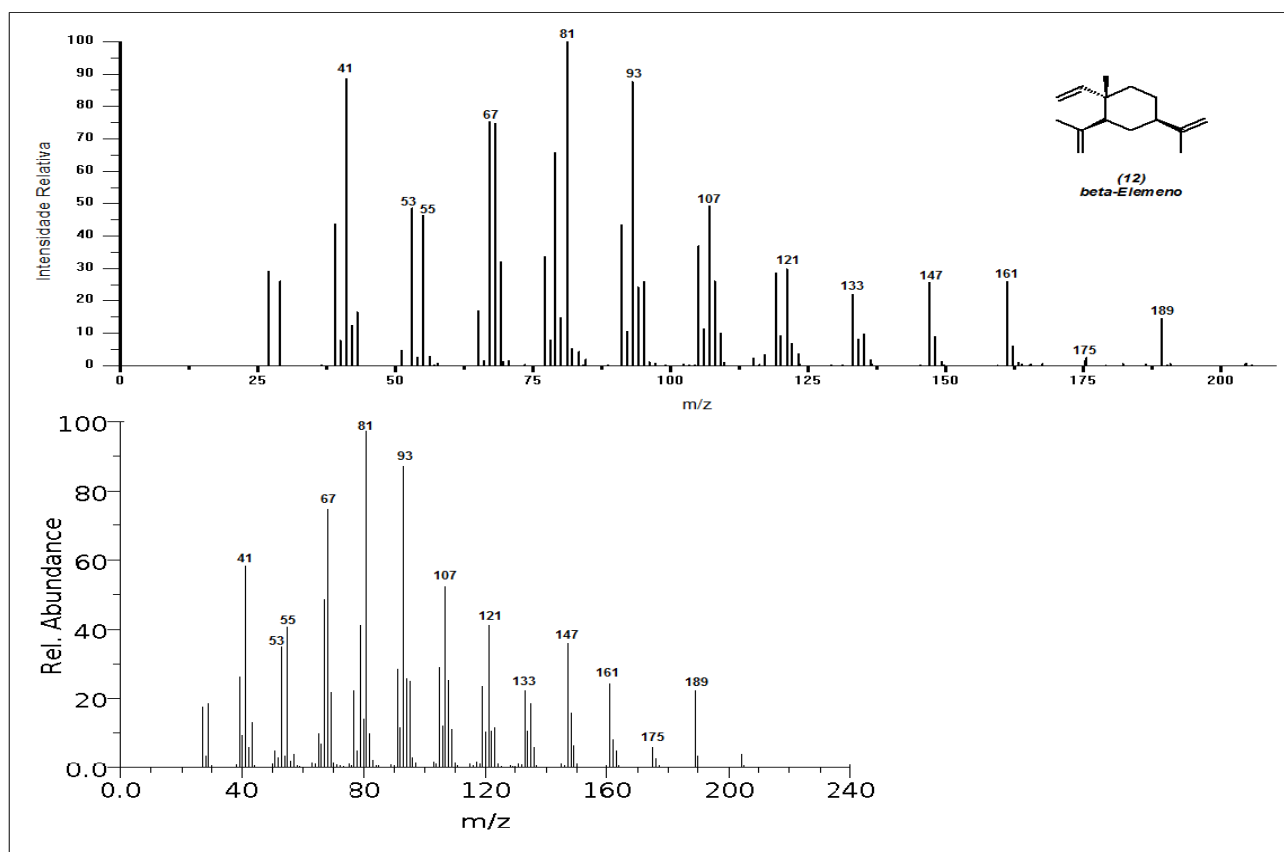
*Espectros de massas do trans-Verbenol. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



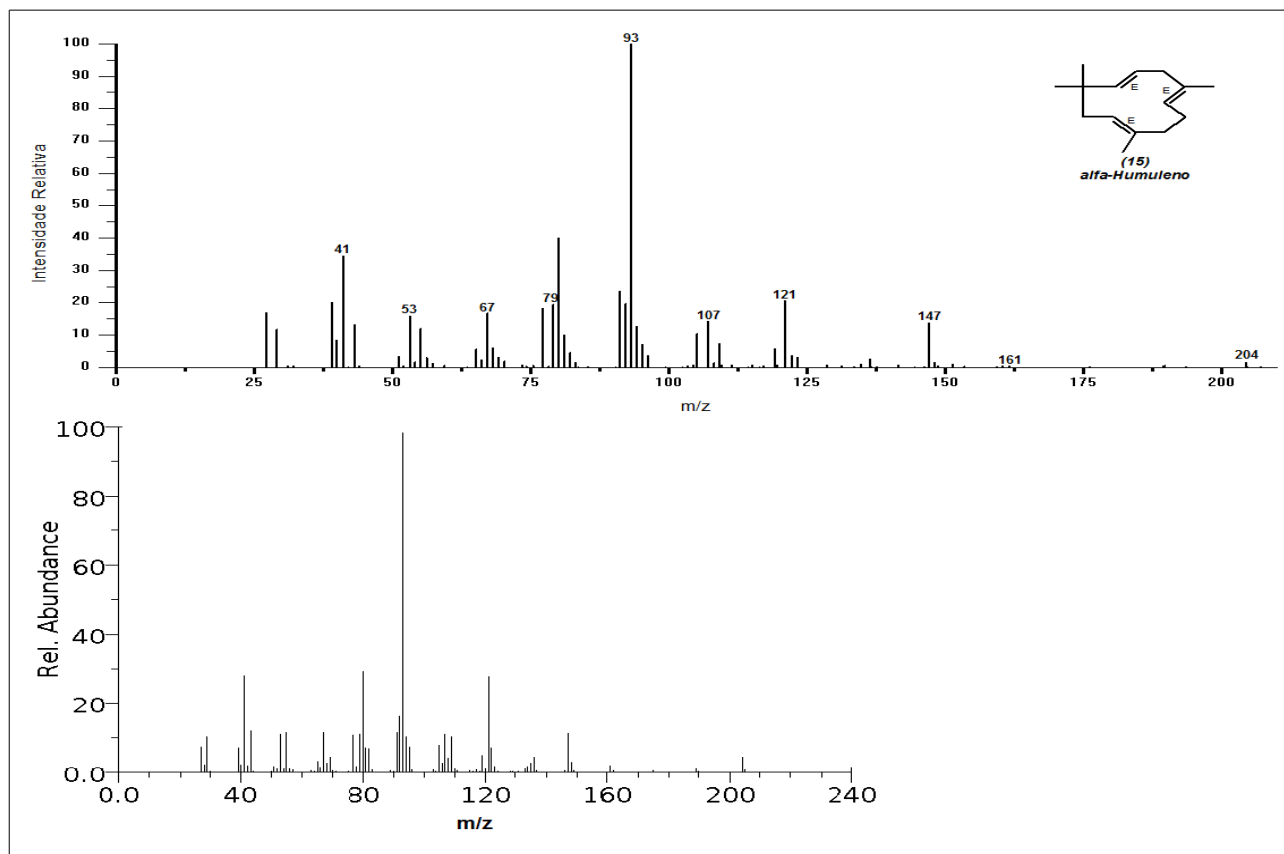
*Espectros de massas do cis-Crisantenol. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



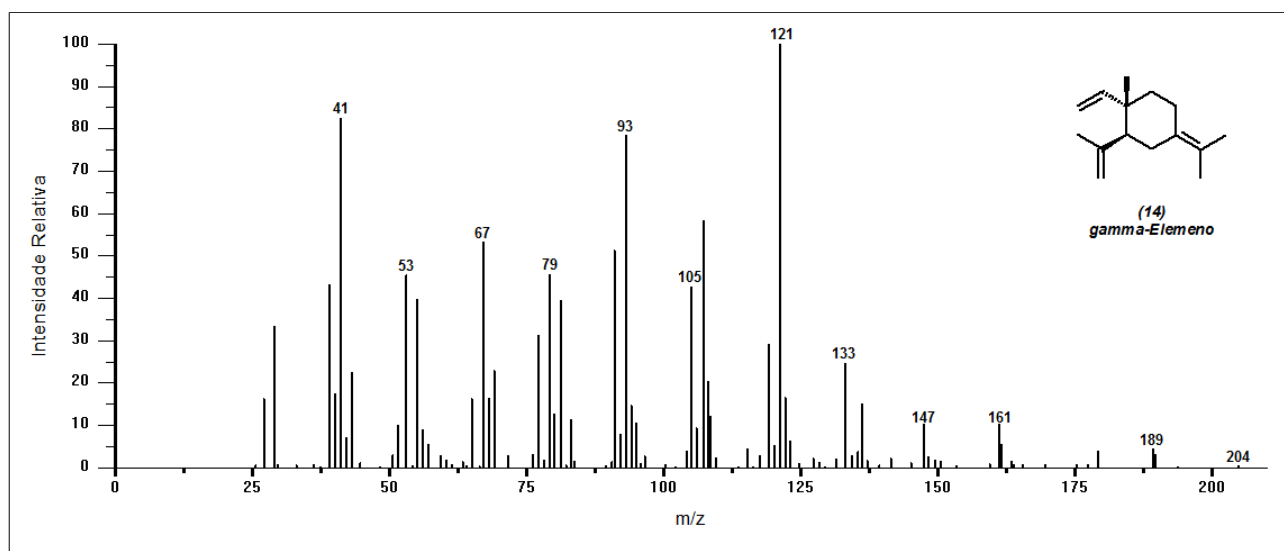
*Espectros de massas do Acetato de geranila. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



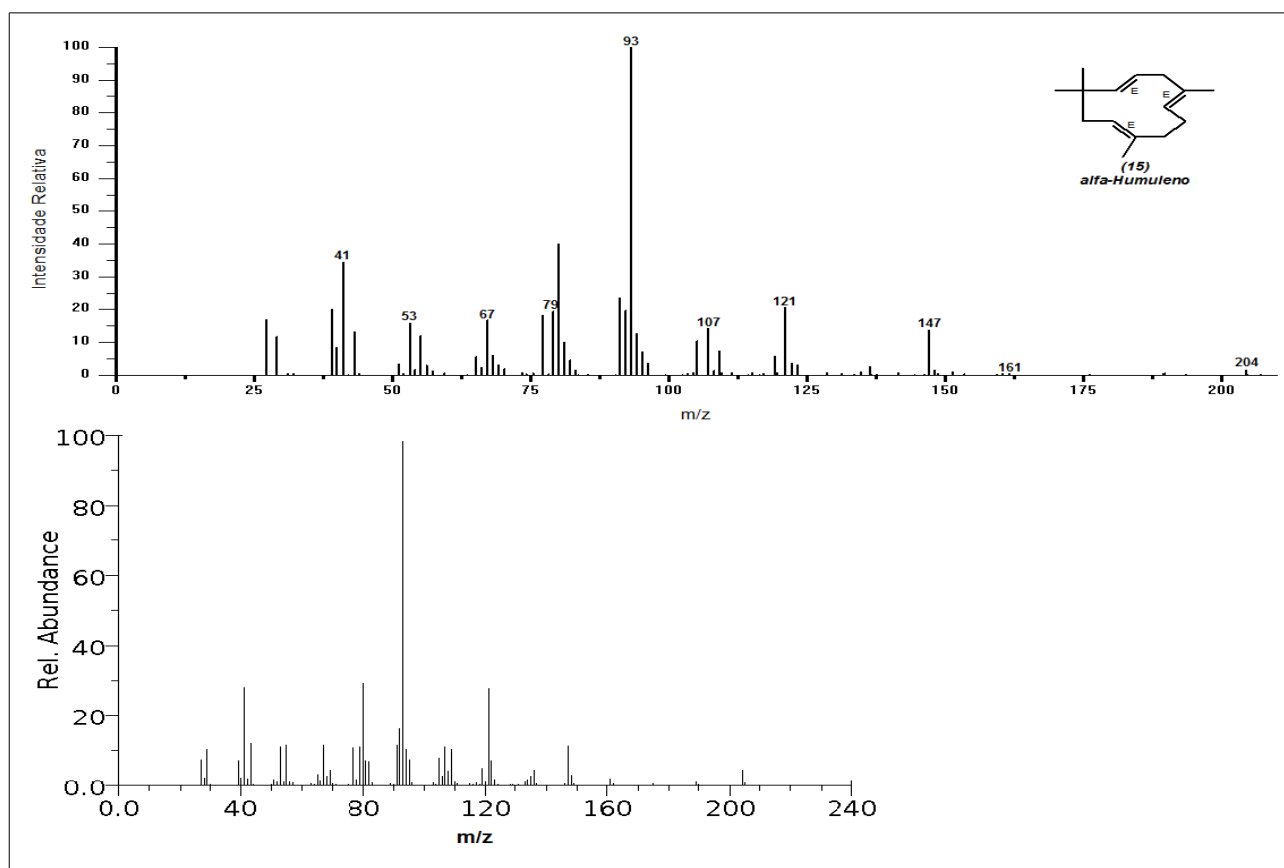
*Espectros de massas do β -Elemeno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



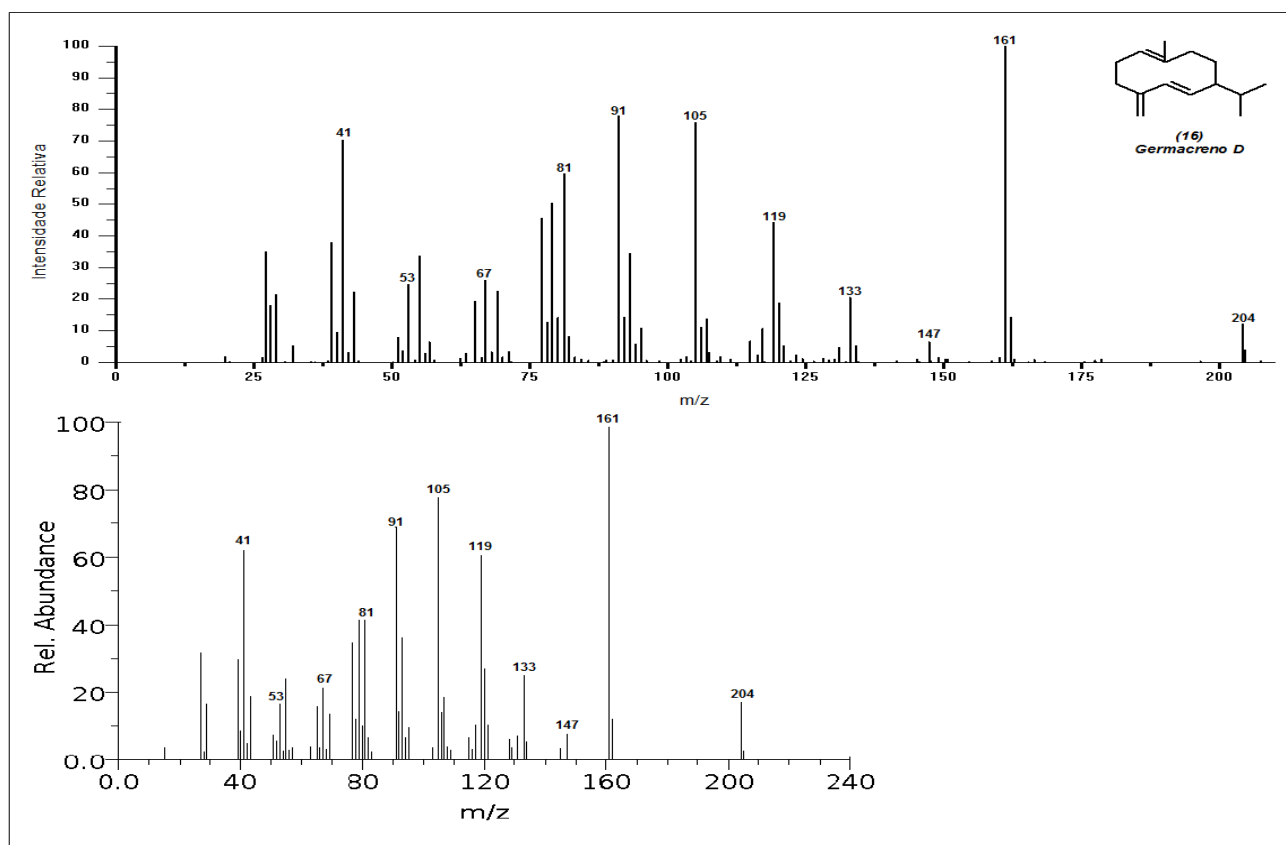
*Espectros de massas do β -Cariofileno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



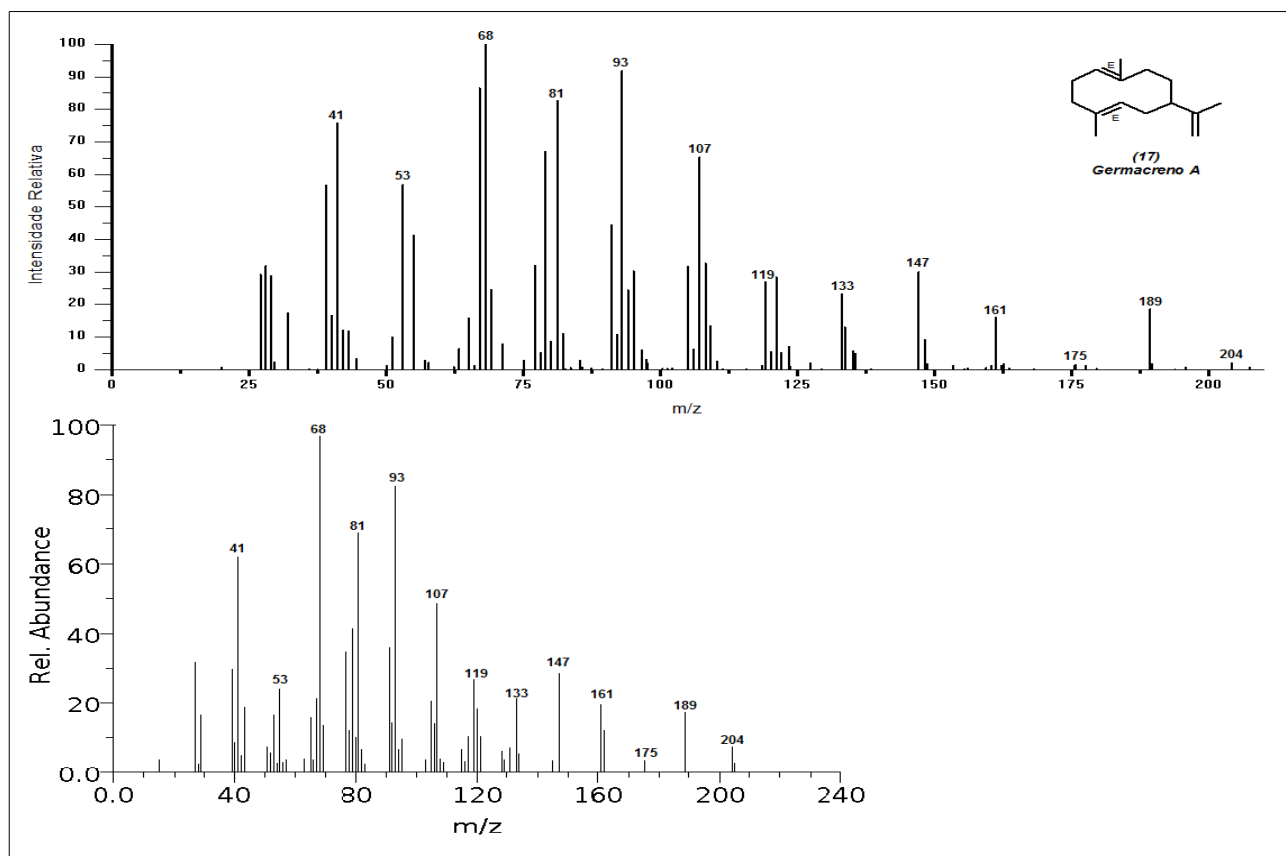
*Espectros de massas do γ -Elemeno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



*Espectros de massas do α -Humuleno. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



*Espectros de massas do Germacrene-D. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*



*Espectros de massas do Germacrene A. Superior: Espectro de massas obtido da amostra.
Inferior: Espectro de massas proveniente de biblioteca eletrônica (NIST).*